

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
19 février 2004 (19.02.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2004/014936 A2(51) Classification internationale des brevets⁷:

C07K

(74) Mandataire : CABINET ORES; 36 rue de St Péters-
bourg, F-75008 Paris (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2003/002446

(22) Date de dépôt International : 1 août 2003 (01.08.2003)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

02/09874

2 août 2002 (02.08.2002) FR

(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
MISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR];
31-33 rue de la Fédération, F-75015 Paris (FR). SEDAC
THERAPEUTICS [I/R/FR]; Parc Urasanté, Le Galénis -
Bâtiment B, 85 rue Nelson Mandela, F-59120 Loos (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) :
MAILLIERE, Bernard [FR/FR]; 1 Promenade Vénézia,
F-78000 Versailles (FR). GEORGES, Bertrand [FR/FR];
36 clos de la Ferme, F-59221 Bauvin (FR). CASTELLI,
Florence [FR/FR]; 17/19 rue Paul Bert, F-92100 Mon-
trouge (FR). BOUZID, Ahmed [FR/FR]; 68 avenue de
l'Europe, F-59112 Annoeulin (FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VN, YC, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapportEn ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviation-
s, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.(54) Title: MIXTURE OF PEPTIDES FROM C AND NS3 PROTEINS OF THE HEPATITIS C VIRUS AND APPLICATIONS
THEREOF(54) Titre : MELANGE DE PEPTIDES ISSUS DES PROTEINES C ET NS3 DU VIRUS DE L'HEPATITE C ET LEURS APPLI-
CATIONS.(57) Abstract: The invention relates to a peptide mixture including at least two different peptides from the hepatitis C virus (HCV),
whereby at least one of them is a peptide from the C protein binding to at least four different HLA-II molecules, the occurrence of
which exceeds 5 % in the Caucasian population with a binding activity < 1,000 nM. Said invention also relates to the applications
thereof as a drug useful in the prevention and treatment of HCV infections or as a diagnostic reagent for HCV-specific T lymphocytes.(57) Abrégé : Mélange de peptides incluant au moins deux peptides différents issus du virus de l'hépatite C (VHC), dont l'un au
moins est un peptide issu de la protéine C, se liant à au moins quatre molécules HLA II différentes dont la fréquence est supérieure
à 5 % dans la population caucasienne, avec une activité de liaison < 1000 nM, et ses applications en tant que médicament utile pour
la prévention et le traitement des infections à VHC ou en tant que réactif de diagnostic de lymphocytes T spécifiques du VHC.

WO 2004/014936 A2

MELANGE DE PEPTIDES ISSUS DES PROTEINES C ET NS3 DU VIRUS DE L'HEPATITE C ET LEURS APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un mélange de peptides issus des protéines C et NS3 du virus de l'hépatite C (VHC) ainsi qu'à ses applications en tant que médicament (dans des compositions immunogènes, aptes à stimuler la production de lymphocytes T CD4+ anti-VHC *in vivo* et donc utiles pour la prévention et le traitement des infections à VHC) ou en tant que réactif de diagnostic de lymphocytes T spécifiques du VHC, notamment pour évaluer l'état immunitaire des patients.

Le virus de l'hépatite C (VHC) a été identifié en 1989 comme étant l'agent étiologique majeur des hépatites non-A non-B (Kato et al., P.N.A.S., 1990, 87, 9524-). L'homme est le seul hôte connu du VHC mais le virus peut être transmis expérimentalement aux chimpanzés. Le VHC infecte les hépatocytes, mais également certaines cellules du système immunitaire comme les lymphocytes, les monocytes et les cellules dendritiques.

La transmission du virus est essentiellement parentérale. Toutefois, comme les infections de *novo* sont rarement décelables, la voie de contamination demeure inconnue dans plus de 40% des cas. La prévalence de l'hépatite C est élevée dans la population générale, de l'ordre de 1 à 2% en Afrique, en Amérique, en Europe ainsi qu'en Asie du sud-est (Alter et al., Blood, 1995, 85, 1681-). Elle pourrait atteindre 5% dans certaines régions de Chine et dans le pacifique-ouest. Au Moyen-Orient, la prévalence varie de 1 jusqu'à 12%. Ainsi, il est estimé que 170 millions d'individus dans le monde sont porteurs du VHC.

Le VHC fait partie du genre *Hepacivirus* au sein de la famille des *Flaviviridae*. C'est un virus à ARN brin positif de 9,4 kb. Le génome possède un cadre de lecture ouvert principal qui code pour un long polypeptide clivable en 8 protéines. La protéine de capsid (Core ou C, 191 acides aminés) possède une capacité de liaison à l'ARN viral et constitue la nucléocapside virale. Elle participe également à des effets cytopathogènes directs. Les glycoprotéines E1 et E2 sont insérées dans l'enveloppe du virus et impliquées dans les interactions avec les cellules hôtes notamment via le récepteur CD81. La protéine NS2 possède une fonction métalloprotéase impliquée notamment dans le clivage NS2/NS3. NS3 (631 acides aminés, le premier acide aminé de la protéine NS3 correspond à celui situé en position 1007 dans la

séquence de la polyprotéine du VHC) et NS4 participent à la fois à une activité sérine protéase et ARN hélicase. Les protéines NS5A et NS5B sont des polymérases à ARN participant à la réplication du génome du VHC. Dans ce qui suit, la numérotation des acides aminés est indiquée en référence à la séquence de la polyprotéine du VHC de
5 génotype 1a (SWISSPROT P26664 et Choo et al., P.N.A.S., 1991, 88, 2451-2455) ; il y a lieu de noter que cette numérotation est identique pour tous les génotypes du VHC dans la mesure où leurs polyprotéines présentent la même taille.

Le VHC peut être classifié en 6 génotypes ou clades (désignés de 1-6) et jusqu'à 100 sous-types (désignés par a, b, c, etc). Cette classification selon
10 Simmonds et al. (J. Gen. Virol., 1993, 74, 2391-) est basée sur une analyse phylogénétique des séquences NS5. La variabilité inter-génotypique affecte également, mais à différents degrés, les autres protéines virales. Les génotypes 1-3 ont une distribution mondiale, les génotypes 4 et 5 sont présents principalement en Afrique tandis que le génotype 6 est principalement distribué en Asie. Au sein d'un individu
15 infecté, les VHC ne représentent pas une espèce homogène mais constituent de nombreuses quasi-espèces. Ce phénomène est le résultat de l'apparition de mutations au sein du génome dues à la faible fidélité de réplication de la polymérase virale.

Le VHC occasionne chez l'homme des infections aiguës pouvant se résoudre naturellement mais peut conduire dans plus de 80% des cas à la persistance
20 du virus. La phase aiguë est relativement bénigne avec seulement 20 à 30% des personnes infectées développant des symptômes ou des signes cliniques. Environ 60% des patients ont une augmentation des transaminases témoignant d'une hépatite chronique. Les études épidémiologiques indiquent que 20% des individus porteurs du virus développent une cirrhose après une vingtaine d'années suivie d'une décompensation
25 hépatique, voire d'un hépatocarcinome. Dans les pays industrialisés, le VHC est responsable au total de 20% des hépatites aiguës, de 60% des carcinomes hépatocellulaires et de 30% des transplantations hépatiques. Les traitements actuels (interféron-alpha/ribavirine) permettent la guérison d'environ 50% des patients en phase chronique.

30 Contrairement à l'infection par le VIH, l'infection par le VHC n'est pas systématiquement persistante. De nombreux patients infectés arrivent en effet à surmonter l'infection grâce à une réponse immunitaire efficace. Des lymphocytes T

- auxiliaires (T helper) pourraient être impliqués dans le contrôle précoce de la répliation virale (Thimme et al; J Exp. Med., 2001, 194, 1395). En effet, une forte activité des lymphocytes T auxiliaires, spécifiques des protéines C, NS3, NS4 et NS5, et de type Th1 (c'est-à-dire sécrétant des interleukines telles que l'IL2 et l'IFN γ) est associée au processus de guérison spontanée (Diepolder et al., Lancet, 1995, 346, 1006-; Pape et al., J. Virol. Hepat. Suppl., 1999, 1, 36; Gerlach et al., Gastroenterology, 1999, 117, 933). A l'inverse, une réponse T helper Th2 (c'est-à-dire caractérisée par la sécrétion d'IL4 et d'IL5) est associée à un mauvais pronostic de l'évolution de l'infection à VHC (Tai et al., J. Biomed. Sci., 2001, 8, 321). L'implication des lymphocytes T auxiliaires dans l'évolution de l'infection à VHC a été confortée par des analyses immunogénétiques révélant une corrélation entre la guérison spontanée et les allèles HLA de classe II (HLA-DRB1*1101/DQB1*03 ; Thurzs et al., J. Virol. Hepat., 1997, 4, 215).

- En revanche, chez les patients infectés chroniques, un nombre restreint d'épitopes T sont capables de restimuler, *in vitro*, les lymphocytes T issus du sang périphérique ou de prélèvements hépatiques et il est donc difficile de mesurer la production d'interféron γ par les lymphocytes T auxiliaires, après stimulation par les protéines virales (Core, NS3, NS4 et NS5). Il semblerait que l'orientation de la réponse immunitaire vers un profil du type Th0/Th2, ainsi qu'une tolérance aux antigènes viraux soient à l'origine de cette perte de l'immunité anti-virale et donc de la persistance du VHC.

- Les réponses cellulaires médiées par les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires sont très souvent impliquées dans les mécanismes anti-viraux. Spécifiques des antigènes, les lymphocytes T CD4⁺ sont en effet capables de détecter la présence d'un agent pathogène et sous l'effet de cette reconnaissance, de déclencher une réponse immunitaire. La reconnaissance des antigènes conduit en effet à leur activation. Une fois activés, les lymphocytes T CD4⁺ sécrètent la plupart des cytokines nécessaires au recrutement de cellules effectrices que sont les lymphocytes CD8⁺ cytotoxiques et les lymphocytes B producteurs d'anticorps. Ils interviennent également dans l'activation des cellules par des contacts cellulaires et par exemple induisent l'activation par le CD40 des cellules dendritiques présentatrices de l'antigène. Enfin, ils peuvent jouer

eux-mêmes le rôle d'effecteurs en produisant des lymphokines anti-virales comme $\text{ITFN-}\gamma$ et $\text{TNF-}\alpha$.

- Que le rôle bénéfique des lymphocytes T CD4^+ dans la résolution de l'infection par le VHC résulte d'une action directe ou indirecte, il constitue un important argument en faveur de vaccins dirigés contre le VHC et capables de stimuler une forte réponse CD4^+ de type Th1. En particulier, l'utilisation de peptides capables de stimuler ces cellules constituerait une approche vaccinale très intéressante à la fois efficace et économiquement viable. Toutefois, les peptides que reconnaissent les lymphocytes T auxiliaires sont difficiles à définir en raison du polymorphisme des molécules HLA II.

- En effet, les lymphocytes T CD4^+ ne reconnaissent les antigènes que sous la forme de peptides présentés par les molécules HLA II. Plus précisément, l'activation des lymphocytes T CD4^+ se fait sous l'effet de la présentation de peptides par les molécules HLA II que portent les cellules présentatrices (APC). Ces peptides, appelés épitopes T, résultent de la dégradation protéolytique des antigènes par l'APC. Ils ont des longueurs variables généralement de 13 à 25 acides aminés et possèdent une séquence qui les rend capables de se lier aux molécules HLA II. Les molécules HLA II sont des hétérodimères, capables de lier un répertoire important de peptides ayant des séquences très différentes. Il existe quatre types de molécules HLA II par individu (2 HLA-DR, 1 HLA-DQ et 1 HLA-DP), la molécule HLA-DR dont la chaîne β est codée par le gène DRB1 étant la plus exprimée. Ces isoformes possèdent des propriétés de liaison différentes entre elles, ce qui implique qu'elles peuvent lier des peptides différents d'un même antigène. Elles sont très polymorphes et on a dénombré au moins 200 allèles différents pour DRB1. Les molécules issues des locus DRB3, DRB4, DRB5 et DPB1 sont moins polymorphes. Du fait de ce polymorphisme, chaque individu reconnaît dans un antigène un ensemble de peptides dont la nature dépend des molécules HLA II qui le caractérisent.

Au polymorphisme des molécules HLA II, il faut ajouter la difficulté de trouver des séquences conservées entre les différentes souches de VHC.

- Un des moyens le plus utilisé pour définir les épitopes T CD4^+ de type auxiliaire est de mesurer la capacité de peptides à faire proliférer les cellules mononucléées d'individus ayant été en contact avec l'antigène considéré.

Un certain nombre d'Auteurs ont identifié des peptides du VHC comme étant des épitopes T chez les patients étudiés :

- Diepolder et al., précités, ont montré l'existence d'épitopes du VHC issus de la protéine NS3 (NS3 1248-1261, NS3 1388-1407, NS3 1450-1469) reconnus par des lignées T auxiliaires obtenus à partir de patients en phase aiguë.
- Lamonaca et al. (Hepatology, 1999, 30, 10888) ont identifié cinq épitopes majeurs (Core 21-40, NS3 1253-1272, NS4 1767-1786, NS4 1907-1926, NS4 1909-1929), selon une approche similaire. Ces peptides sont à la fois immunodominants, conservés et présentés par plusieurs molécules HLA II ; sont plus particulièrement décrits 4 peptides immunodominants : C 21-40, NS3 1253-1272 et NS4 1767-1786, 1907-1926 et 1909-1929. Les tests de liaison à des molécules HLA II les plus fréquentes dans la population caucasienne et mondiale (DR1, DR4, DR7, DR11, DR15, DRB5, DR6, DR8 et DR9) présentés dans le tableau 3 de ce document montrent que seuls les peptides issus de NS3 et de NS4 (NS3 1253-1272, NS4 1767-1786 et NS4 1909-1929) se lient avec une activité de liaison inférieure à 1000 nM à aux moins 4 des molécules HLA II dont la fréquence est supérieure à 5 % dans la population caucasienne (DR1, DR4, DR11, DR7, DR15 et DRB5). En revanche, le peptide issu de la protéine C (C 21-40) se lie avec une forte affinité uniquement à une de ces molécules HLA II, à savoir DR15.
- Tabatabai et al. (Hum. Immunol. 1999, 60, 105) ont identifié plusieurs épitopes majeurs (NS3 1384-1401, NS3 1454-1471) chez un unique patient chroniquement infecté ; ces épitopes sont capables d'induire la prolifération et la production d'IL-2.
- Godkin et al. (Eur. J. Immunol., 2001, 31, 1438 ; voir également la Demande Internationale PCT WO 02/34770 au nom de Imperial College Innovations Ltd) ont identifié plusieurs épitopes T helper restreints par l'allèle HLA-DR11, chez plusieurs patients non-virémiques ou chroniquement infectés ; il s'agit de peptides et polypeptides restreints à DR11 et non de mélanges de peptides se liant aux molécules HLA II les plus fréquentes dans la population caucasienne.
- Hoffmann et al. (Hepatology, 1995, 21, 632) ont démontré que les cellules mononucléées du sang périphérique de patients en phase chronique reconnaissent plusieurs peptides dérivés de la protéine Core.

Il existe d'autres études similaires, toutes basées sur les réponses de cellules mononucléées de patients infectés par le VHC (Woitas et al., J. Immunol., 1997, 159, 1012 ; Lechmann et al., Hepatology, 1996, 24, 790 ; Leroux-Roels et al., Hepatology, 1996, 23, 8 ; Lohr et al., Liver, 1996, 16, 174.

5 Les peptides épitopes T identifiés dans ces études, qui sont issus des protéines les plus conservées du VHC (C et NS3), sont illustrés au Tableau I.

Tableau I : Séquences des peptides C et NS3 identifiés comme étant des épitopes T par des tests de prolifération

Peptide	Restriction HLA	Référence	Peptide	Restriction HLA	Référence
C1-24	-	Woitas	C131-150	-	Hoffmann
C21-40	DRB1*1101 DQB1*0301	Lamonaca	C133-152	-	Leroux-Roels
C20-44	-	Woitas Lechmann.	C138-162	-	Lechmann
C23-42	-	Hoffmann	C141-155	DR11	Godkin WO 02/34770
C31-45	DR11	Godkin WO 02/34770	C142-161	-	Hoffmann
C39-63	DR4	Lechmann	C141-160	-	Woitas
C41-60	-	Lamonaca	C145-164	-	Leroux-Roels
C47-70	-	Lohr	C148-172	DR11	Woitas Lechmann
C55-74	-	Hoffmann	C153-172	-	Hoffmann
C66-85	-	Hoffmann	C157-176	-	Leroux-Roels
C73-92	-	Leroux-Roels	C161-180	DRB1*08032	Kaneko
C71-90	-	Lamonaca	C168-192	-	Woitas Lechmann
C79-103	-	Woitas Lechmann	N1205-1221	DR11	Godkin WO 02/34770
C81-100	-	Lamonaca	N1242-1261 ^o	-	Diepolder
C85-104	-	Leroux-Roels	N1248-1261	DRB1*0404 DRB1*1101 DRB1*1201 DRB1*1301 DRB1*1601	Diepolder
C91-110	-	Lamonaca	N1248-1267	-	Diepolder
C97-116	-	Leroux-Roels Lamonaca	N1245-1269	DR11	Godkin
C101-115	-	Lohr	N1253-1272	DQB1*0301	Lamonaca
C111-130	DRB1*08032	Kaneko	N1293-1331	-	Tabatai
C109-128	-	Leroux-Roels Hoffmann	N1388-1407	DRB1*1501	Diepolder
C120-139	-	Hoffmann	N1384-1401	-	Tabatai
C121-140	-	Leroux-Roels	N1450-1469	DRB1*1302	Diepolder
C118-142	-	Woitas	N1447-1464	-	Tabatai
C128-152	-	Woitas Lechmann	N1454-1471	-	Tabatai

- Non déterminé / ^o et variants de ces peptides dont le peptide minimum N1251-1259.

- Il ressort du Tableau I que les séquences des épitopes T varient d'une étude à l'autre, traduisant le manque de précision de cette approche. Il est en effet difficile, au vu de la diversité des réponses observées, de définir des séquences épitopes T pour l'ensemble de la population caucasienne. Ces séquences ne sont
- 5 adaptées qu'aux patients ayant servi à ces travaux. Ces différences de réponse s'expliquent d'une part par la représentativité des échantillons qui n'est pas évaluée. En particulier, dans les études où les patients ne sont pas typés pour leurs molécules HLA, nul ne sait si les différents allèles sont représentés selon les fréquences de la population générale. La réponse de nombreux patients à un peptide particulier peut
- 10 alors résulter d'un biais de l'échantillonnage et non de la capacité effective d'un peptide à être reconnu par l'ensemble des patients. D'autre part, dans le cas de l'infection par le VHC, plusieurs études ont été effectuées sur des patients infectés de manière chronique. Du fait de la persistance du virus chez ces sujets, il est possible qu'ils présentent une tolérance aux épitopes T les plus efficaces à être présentés. Dans
- 15 ce contexte, les épitopes les plus intéressants pourraient avoir disparu de la réponse immunitaire qui se maintiendrait pour des épitopes moins stimulants mais qui ne parviendrait pas à éliminer le virus. Cette hypothèse est d'ailleurs émise par Tabatabai et al., précité. Ces tests de prolifération sont donc insuffisants pour définir des séquences adaptées à la vaccination de l'ensemble de la population.
- 20 Parmi les peptides ayant une activité de stimulation de lymphocytes T identifiés, quelques uns seulement se lient aux molécules HLA II (Tableau II).

Tableau II : Liaison des peptides C et NS3 aux molécules HLA II

Peptides	Liaison à
C21-40	DRB1*1501
N1242-1261	DRB1*0101, 1501, 0401, 0404, 1101, 1302, 0701, 0802, 0901, DRB5* 0101
N1248-1267	DRB1*0101, 1501, 0401, 0404 1101, 1302, 0701, 0802, 0901
N1248-1261	DRB1*0101, 1501, 0401, 0404, 0405, 1101, 1302, 0802, 0901
N1253-1272	DRB1*0101, 0401, 1101, 701, 1501, 1302, 0802, 0901
N 1388-1407	AUCUN
N1450-1469	AUCUN

Dans l'article aux noms de Diepolder et al., précité, les Auteurs ont en effet étudié pour 5 peptides de la protéine NS3, la capacité à lier des molécules HLA II fréquemment rencontrées. De fait, ils ont montré que l'épitope NS3 1248-1261 ou des peptides variants (1242-1261 et 1248-1267) présentent une capacité de liaison pour 9 à 10 allèles HLA-DR à savoir : DRB1*0101, 1501, 0401, 0404, 0405, 1101, 1302, 0802, 0901 et DRB5*0101. En revanche, les peptides 1388-1407 et 1450-1469 sont inactifs.

10 Dans l'article de Lamonaca et al., précité, les Auteurs ont également montré, par des tests de liaison, que le peptide Core 21-40 se lie à DRB1*1501 et que le peptide NS3 1253-1272 se lie à DRB1*0101, 0401, 1101, 701, 1501, 1302, 0802, 0901.

Il ressort de ce qui précède qu'aucun peptide du VHC se liant aux molécules HLA II les plus fréquemment rencontrées dans la population caucasienne, n'a été identifié pour la protéine C qui est la plus conservée et donc particulièrement adaptée à la vaccination contre les différents génotypes du VHC. En outre, parmi les peptides de la protéine NS3 ayant une activité de stimulation de lymphocytes T qui ont été étudiés, un seul peptide se lie aux molécules HLA II les plus fréquemment rencontrées dans la population caucasienne.

Il existe un nombre important de molécules HLA II dont la répartition n'est pas homogène dans le monde. Ainsi, dans une population donnée un ensemble d'allèles regroupe à lui seul l'essentiel des allèles de la population. Par exemple en France qui est une population caractéristique de la population caucasienne (USA, Europe), seuls 7 allèles du locus DRB1 dépassent les 5 %. Il s'agit des allèles DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 qui représentent à eux seuls 64% de la population. Ces mêmes allèles sont les plus abondants allèles HLA-DR dans les autres populations caucasiennes. Leur fréquence varie entre 53% (en Espagne) à 82% (au Danemark). Pour les Etats-Unis et le Canada, ils représentent respectivement 58 et 55% des allèles de la population. Les molécules HLA-DRB3, -DRB4 et DRB5 qui sont des molécules HLA-DR dont la chaîne β n'est pas codée par le gène DRB1 sont présentes également avec des fréquences alléliques importantes, car elles sont moins polymorphes que les molécules DRB1. Leur fréquence allélique est en effet de 9,2% pour DRB3*0101, 28,4% pour DRB4*0101 et 7,9% pour DRB5*0101. Elles couvrent donc à elles seules 45% de la fréquence allélique. Enfin, les molécules HLA-DP4 qui regroupent les molécules codées par les allèles DPB1*0401 et DPB1*0402 sont les molécules HLA II les plus abondantes en Europe et aux Etats-Unis. Leur fréquence allélique est en effet de 40 % et 11 % respectivement, ce qui signifie qu'elles sont l'une ou l'autre trouvées chez environ 76% des individus. Les peptides présents dans une séquence peptidique et qui lient l'ensemble de ces allèles incluent donc les épitopes T de la majorité de la population.

C'est pourquoi les Inventeurs se sont donnés pour but de pourvoir à un ensemble de peptides aptes à être incorporés dans une composition immunogène et à stimuler des lymphocytes T CD4+ anti-VHC, chez la majorité des individus caucasiens européens ou d'Amérique du Nord, pour induire effectivement une réponse proliférative et multiépitopique (qui fait appel à plusieurs épitopes) spécifique des composants du virus.

Un tel ensemble a pour propriété d'être efficace chez un grand nombre de sujets, alors que les peptides de l'art antérieur sont actifs chez quelques individus et sont inactifs chez la majorité des autres individus, parce que ces derniers ne reconnaissent pas les protéines du VHC par les mêmes déterminants.

Pour ce faire, les Inventeurs ont identifié les séquences de peptides issus des protéines C et NS3 du VHC restreints aux molécules HLA II prépondérantes dans les populations caucasiennes et ils ont montré que les peptides issus de la protéine C, de préférence associés à des peptides issus de la protéine NS3, induisent
5 effectivement une réponse immunogène et protectrice chez un grand nombre d'individus, qui implique plusieurs épitopes.

En outre, ces peptides qui reconnaissent des lymphocytes T spécifiques d'HCV chez les patients infectés, sont utiles pour le diagnostic de l'état immunitaire de ces patients vis-à-vis du virus de l'hépatite C.

10 La présente invention a en conséquence pour objet un mélange de peptides, caractérisé en ce qu'il inclut au moins deux peptides différents issus du virus de l'hépatite C (VHC), dont l'un au moins est un peptide issu de la protéine C, se liant à au moins quatre molécules HLA II différentes dont la fréquence allélique est supérieure à 5 % dans la population caucasienne, avec une activité de liaison < 1000 nM.

15 Conformément à l'invention, ledit mélange comprend également, outre ledit peptide C tel que défini ci-dessus, un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes CD8+, CD4+ ou B et plus particulièrement des épitopes issus d'une protéine du VHC, notamment au moins un peptide issu de la protéine NS3, se liant à au moins quatre molécules HLA II différentes dont la
20 fréquence allélique est supérieure à 5 % dans la population caucasienne, avec une activité de liaison < 1000 nM.

L'invention englobe les peptides issus des protéines C et NS3 de n'importe quel génotype du VHC.

25 Conformément à l'invention, on entend par "molécules HLA II différentes" aussi bien des molécules HLA DP et DQ codées par des allèles différents que des molécules DR codées par des gènes différents ou des allèles différents d'un même gène.

Avantageusement, les dites molécules HLA II sont choisies parmi les molécules HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR11, HLA-DR13,
30 HLA-DR15, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5 et HLA-DP4.

De manière particulièrement avantageuse, les dites molécules HLA II sont codées respectivement par les allèles HLA DRB1*0101, DRB1*0301,

DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301, DRB1*1501, DRB3*0101, DRB4*0101, DRB5*0101, DP*0401 et DP*0402.

Un tel mélange de peptides permet d'obtenir, de manière surprenante, une réponse proliférative T CD4+ (stimulation des lymphocytes T CD4+) et ce, chez la grande majorité de la population caucasienne à protéger et quel que soit le génotype du VHC concerné ; on peut donc considérer qu'un tel mélange constitue un premier pas vers une composition immunogène « universelle », apte à être effectivement utilisée dans un vaccin.

Selon une disposition avantageuse dudit mélange, les peptides issus de la protéine C du virus de l'hépatite C, sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

a) les peptides correspondant aux positions 19-47, 27-51, 31-57, 104-133 et 127-167,

b) les peptides d'au moins 11 acides aminés inclus dans les peptides tels que définis en a), et

c) les peptides dérivés des peptides tels que définis en a) ou en b) par substitution par des résidus alanine (C → A), de résidu(s) cystéine situé(s) en position +1 ou +2, relativement au résidu d'acide aminé en position N terminale et/ou en position -1, -2 ou -3, relativement au résidu d'acide aminé en position C terminale.

Avantageusement, les peptides d'au moins 11 acides aminés tels que définis en b) sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- le peptide inclus dans le peptide 27-51 correspondant aux positions 27-41,

- le peptide inclus dans le peptide 31-57 correspondant aux positions 31-45, et

- les peptides inclus dans le peptide 127-167 correspondant respectivement aux positions 127-149, 131-145, 131-148, 134-148 et 148-167.

Avantageusement, les peptides tels que définis en c) sont sélectionnés dans le groupe constitué par le peptide dérivé du peptide C 127-149 de séquence TAGFADLMGYIPLVGAPLGGAAR (SEQ ID NO: 5).

Selon une autre disposition avantageuse dudit mélange, les peptides issus de la protéine NS3, sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

d) les peptides correspondant respectivement aux positions 1007-1037, 1036-1055, 1052-1072, 1076-1093, 1127-1153, 1149-1172, 1174-1195, 1190-1212, 1206-1239, 1246-1275, 1275-1304, 1361-1387, 1377-1403, 1404-1432, 1456-1481, 1495-1513, 1524-1553 et 1552-1583,

5 e) les peptides d'au moins 11 acides aminés inclus dans les peptides précédents, et

f) les peptides dérivés des peptides tels que définis en d) ou en e) par substitution par des résidus alanine (C → A), de résidu(s) cystéine situé(s) en position +1 ou +2, relativement au résidu d'acide aminé en position N terminale et/ou en position -1, -2 ou -3, relativement au résidu d'acide aminé en position C terminale.

10 Avantageusement, les peptides d'au moins 11 acides aminés tels que définis en e) sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- les peptides inclus dans le peptide 1007-1037 correspondant respectivement aux positions 1007-1021, 1015-1029, 1015-1037, 1019-1033 et 1020-15 1034,
- les peptides inclus dans le peptide 1174-1195 correspondant respectivement aux positions 1174-1188, 1174-1192 et 1178-1192,
- les peptides inclus dans le peptide 1190-1212 correspondant respectivement aux positions 1190-1204 et 1192-1206,
- 20 - les peptides inclus dans le peptide 1246-1275 correspondant respectivement aux positions 1246-1260, 1246-1264, 1250-1264 et 1261-1275,
- les peptides inclus dans le peptide 1377-1403 correspondant respectivement aux positions 1381-1395, 1381-1397, 1381-1403 et 1383-1397,
- le peptide inclus dans le peptide 1495-1513 correspondant respecti- 25 vement aux positions 1495-1509,
- les peptides inclus dans le peptide 1524-1553 correspondant respectivement aux positions 1524-1552, 1524-1538, 1528-1542, 1528-1552, 1529-1543, 1534-1548, 1538-1552 et 1540-1553, et
- les peptides inclus dans le peptide 1552-1583 correspondant 30 respectivement aux positions 1559-1573 et 1563-1577.

Avantageusement, les peptides tels que définis en f) sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- le peptide dérivé du peptide 1076-1093 de séquence
GVAWTVYHGAGTRTIASP (SEQ ID NO: 10),
- le peptide dérivé du peptide 1149-1172 de séquence
RGSLLSPRPISYLKSSGGPLLAP (SEQ ID NO: 13),
- 5 - le peptide dérivé du peptide 1377-1403 de séquence
GKAIPLEVIKGRHLIFCHSKKKADEL (SEQ ID NO: 20),
- le peptide dérivé du peptide 1456-1481 de séquence
TAVTQTVDFSLDPTFTIETITLPQDA (SEQ ID NO: 22), et
- le peptide dérivé du peptide 1524-1553 de séquence
10 GAAWYELTPAETTVRLRAYMNTPLPVAQD (SEQ ID NO: 24) et les peptides
inclus dans la séquence SEQ ID NO: 24 correspondant respectivement aux positions
1524-1538, 1524-1552, 1528-1552, 1538-1552 et 1540-1553.

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit mélange, il
inclut des peptides issus des protéines C et NS3 du VHC de génotype 1, de préférence
15 de sous-type 1a ou 1b.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit
mélange, il inclut 2 à 6 peptides différents issus des protéines C et NS3, tels que
définis ci-dessus, l'ensemble des peptides se liant à au moins 10 molécules HLA II
dont la fréquence allélique est supérieure à 5 % dans la population caucasienne.

20 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, lesdits
peptides sont sélectionnés dans le groupe constitué par les peptides issus de la protéine
C correspondant respectivement aux positions 27-51, 131-167, 127-149, 131-148,
148-167 et les peptides issus de la protéine NS3 correspondant respectivement aux
positions 1007-1037, 1015-1037, 1036-1055, 1174-1192, 1190-1212, 1246-1264,
25 1381-1403, 1381-1397, 1524-1553, 1528-1552 et 1552-1583.

Par exemple:

- le peptide C 19-47 se lie avec une bonne affinité aux molécules
DR1, DR7, DR11, DR13, DR15, DRB5 et DP402 codées par les allèles tels que
définis ci-dessus,
- 30 - le peptide C 31-57 se lie avec une bonne affinité aux molécules
DR1, DR7, DR11, DR13, DR15, DRB5, DP401 et DP402 codées par les allèles tels
que définis ci-dessus,

- le peptide C 104-133 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR7, DR11 et DRB5 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide C 127-149 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR7, DR11, DR15 et DRB5 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- 5 - le peptide NS3 1007-1037 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DRB4, DRB5 et DP402 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1036-1055 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR4, DR11, DRB4 et DRB5, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- 10 - le peptide NS3 1052-1080 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR4, DR7, DR11, DR15, DRB4 et DRB5, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1076-1093 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR7, DR11, DR15, et DRB5, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- 15 - le peptide NS3 1127-1153 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR7, DR11, DR13, et DRB5, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1149-1172 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR7, DR15, DRB4, et DRB5, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- 20 - le peptide NS3 1174-1195 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR4, DR7, DR11, DR15, DRB4, et DRB5, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- 25 - le peptide NS3 1190-1212 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR4, DR7, DR11, DR15 et DRB5, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1206-1239 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR4, DR7, DR11 et DRB5, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- 30

- le peptide NS3 1246-1275 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR4, DR7, DR11, DR13 et DR15, codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1275-1304 se lie avec une bonne affinité aux 5 molécules DR1, DR4, DR7, DR11, DR15, DRB3 et DP401 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1361-1387 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR7, DR15 et DRB5 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1377-1403 se lie avec une bonne affinité aux 10 molécules DR1, DR7, DR11, DR13, DRB4 et DRB5 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1404-1432 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR4, DR7, DR15 et DRB5 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- 15 - le peptide NS3 1456-1481 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DRB3, DRB4 et DRB5 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1495-1513 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR7, DR11, DR15, DRB3, DRB4 et DRB5 codées par les allèles tels 20 que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1524-1553 se lie avec une bonne affinité aux molécules DR1, DR4, DR7, DR11, DR15, DRB3, DRB4, DRB5 et DP402 codées par les allèles tels que définis ci-dessus,
- le peptide NS3 1552-1583 se lie avec une bonne affinité aux 25 molécules DR1, DR7, DR11, DR15, DRB5, DP401 et DP402 codées par les allèles tels que définis ci-dessus.

Conformément à l'invention, les peptides inclus dans ledit mélange sont sous forme, soit de peptides individualisés, soit d'une protéine de fusion comprenant une séquence des peptides dudit mélange, à l'exclusion de la séquence 30 correspondant à la fusion des peptides C 31-45, C 141-155 et NS3 1207-1221.

Lesdits peptides individualisés sont préparés selon les procédés classiques de synthèse en parallèle sur phase solide et ladite protéine de fusion est

préparée selon les techniques classiques d'ADN recombinant, dans un système d'expression approprié.

Ladite protéine de fusion comprend les séquences desdits peptides directement reliées entre-elles par une liaison peptidique ou bien séparées par des séquences exogènes, c'est-à-dire des séquences autres que celles présentes à cette position dans la séquence des protéines C et NS3 du VHC, notamment les séquences d'autres épitopes T CD4+, CD8+ ou B, par exemple du VHC.

La présente invention a également pour objet une molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine de fusion telle que définie ci-dessus.

L'invention a également pour objet tout vecteur recombinant, notamment plasmide ou virus, comprenant au moins une molécule d'acide nucléique telle que définie ci-dessus, placée sous le contrôle des éléments nécessaires à la transcription de ladite molécule, notamment sous le contrôle d'un promoteur et d'un terminateur de transcription.

L'invention concerne également les cellules hôtes, notamment bactéries, levures ou cellules de mammifère, transformées à l'aide d'un vecteur tel que défini ci-dessus, de manière à intégrer de façon stable dans leur génome ou à maintenir de manière stable, au moins une molécule d'acide nucléique telle que définie ci-dessus.

La présente invention a également pour objet une composition immunogène anti-VHC, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

- un mélange de peptides issus d'une protéine C et d'une protéine NS3 du VHC, tels que définis ci-dessus, et/ou
 - une molécule d'acide nucléique telle que définie ci-dessus, ou
 - un vecteur approprié tel que défini ci-dessus, notamment un virus,
- en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement au moins un adjuvant.

Les adjuvants utilisés sont des adjuvants classiquement utilisés dans les compositions vaccinales, tels que l'hydroxyde d'alumine et le squalène.

On peut utiliser entre autres des vecteurs viraux tels que les adénovirus, les rétrovirus, les lentivirus et les AAV, dans lesquels a été insérée préalable-

ment la séquence d'intérêt ; on peut également associer ladite séquence (isolée ou insérée dans un vecteur plasmidique) avec une substance capable d'assurer une protection desdites séquences dans l'organisme ou lui permettant de franchir la membrane des cellules-hôte, par exemple une préparation de liposomes, de lipides ou de polymères cationiques, ou bien l'injecter directement dans la cellule hôte, sous forme d'ADN nu.

Par exemple, l'utilisation d'ADN nu pour l'immunisation constitue une approche vaccinale efficace : elle consiste à injecter dans l'organisme hôte à vacciner, un ADN nu codant pour un antigène protéique ; cet ADN permet une synthèse prolongée de l'antigène par les cellules de l'hôte ainsi qu'une présentation durable de cet antigène au système immunitaire.

Selon un mode de réalisation avantageux de ladite composition immunogène, lesdits peptides sont sous forme de peptides modifiés ou bien associés à des liposomes ou à des lipides, notamment sous forme de lipopeptides.

La partie lipidique du lipopeptide est notamment obtenue par addition d'un motif lipidique sur une fonction α -aminée desdits peptides ou sur une fonction réactive de la chaîne latérale d'un acide aminé de la partie peptidique ; elle peut comprendre une ou plusieurs chaînes dérivées d'acides gras en C_{4-20} , éventuellement ramifiées ou insaturées (acide palmitique, acide oléique, acide linoléique, acide linoléique, acide 2-amino hexadécanoïque, pimélaute, trimétauxide) ou un dérivé d'un stéroïde. Le procédé de préparation de tels lipopeptides est notamment décrit dans les Demandes Internationales WO 99/40113 ou WO 99/51630. La partie lipidique préférée est notamment représentée par un groupe N^{α} -acétyl-lysine N^{ϵ} (palmitoyl), également dénommé Ac-K(Pam).

Le peptide modifié est notamment obtenu par modification d'au moins une liaison peptidique -CO-NH- de la chaîne peptidique desdits peptides par introduction d'une liaison de type rétro ou rétro-inverso (-NH-CO-) ou d'une liaison différente de la liaison peptidique (méthylène amino, carba, cétoéthylène, méthylène-oxy...) ou bien par substitution d'au moins un acide aminé de la chaîne peptidique desdits peptides par un acide aminé non protéinogénique, c'est à dire un acide aminé n'entrant pas dans la constitution d'une protéine naturelle, notamment un acide aminé

donc le carbone portant la chaîne latérale, à savoir le groupe -CHR- est remplacé par un motif n'entrant pas dans la constitution d'un acide aminé naturel.

Selon un autre mode de réalisation avantageux de ladite composition immunogène, ledit mélange de peptides est associé :

- 5 - à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes CD8+ (reconnus spécifiquement par les lymphocytes T cytotoxiques et présentés par les molécules HLA I) et plus particulièrement des épitopes CD8+ issus d'une protéine du VHC tels que les peptides C 2-10, 28-36, 35-44, 41-49, 42-50, 85-98, 88-97, 127-140, 131-140, 132-140, 167-176, 178-187, 181-190 ; les peptides E1
10 220-227, 233-242, 234-242, 363-371 ; les peptides E2 401-411, 460-469, 489-496, 569-578, 621-628, 725-733 ; les peptides NS2 826-838, 838-845 ; les peptides NS3 1073-1081, 1169-1177, 1287-1296, 1395-1403, 1406-1415 ; les peptides NS4A 1585-1593, 1666-1675 ; les peptides NS4B 1769-1777, 1789-1797, 1807-1816, 1851-1859 ; le peptide NSSA 2252-2260 et les peptides NSSB 2588-2596, 2727-2735 (Rehermann
15 et al., Current Topics in Microbiology and Immunology, 2000, 242; 299),

- à d'autres peptides comprenant des épitopes CD4+ multiples, tels que le peptide de la toxine tétanique TT (positions 830-846), le peptide de l'hémagglutinine d'*Influenza* HA (positions 307-319), PADRE (Pan DR Epitope, Alexandre J. et al., Immunity, 1994, 1, 9, 751-761) et le peptide LSA3 de *Plasmodium*
20 *falciparum* et/ou

- à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes B, plus particulièrement des épitopes B issus d'une protéine du VHC reconnus spécifiquement par des anticorps dirigés contre ces derniers, tels que le peptide C 5-27 (Khanna et al., Acta Virologica, 1998, 42, 141-145), le peptide NS4
25 1698-1719 (Khanna et al., précité) et le peptide NS5 2295-2315 (Khudyakov et al., Virology, 1995, 206, 666-672).

Les peptides C et NS3 selon l'invention, inclus dans les mélanges, tels que définis ci-dessus ont été avantageusement sélectionnés à l'aide d'un test de liaison HLA II/peptides comprenant :

- 30 - la purification des molécules HLA II d'intérêt, c'est-à-dire celles concernant plus de 5 % d'une population donnée et notamment les molécules HLA DR1, DR3, DR4, DR7, DR11, DR13, DR15, DRB3, DRB4, DRB5 et DP4,

- l'incubation des molécules HLA II ainsi purifiées, avec différentes concentrations de fragments chevauchants et couvrant la séquence de la protéine C ou de la protéine NS3 et avec un réactif R1 ou traceur constitué d'un fragment peptidique associé à un marqueur non radioactif, tel que la biotine et dont la séquence est différente desdits peptides ; le réactif R1 ou traceur est choisi de manière à ce qu'il présente une affinité vis-à-vis de l'une des molécules HLA II d'intérêt, telle qu'il puisse être utilisé à une concentration < 200 nM,

5 - le transfert des complexes obtenus sur une plaque de type ELISA, préalablement sensibilisée avec un anticorps spécifique de toutes les molécules DR ou DP,

- la révélation des complexes molécules HLA II/réactif R1, fixés au fond de la plaque au moyen de conjugués convenables, tels que streptavidine-phosphatase et d'un substrat fluorescent,

15 - la sélection des peptides comprenant des épitopes différents, c'est-à-dire les plus représentatifs des différentes zones d'interaction entre la protéine C ou la protéine NS3 et les molécules HLA II et

- le choix des peptides les plus adaptés, en fonction de la fréquence des allèles vis-à-vis desquels ils présentent une activité de liaison < 1000 nM, de préférence < 800 nM, correspondant à la concentration de ces peptides, qui inhibe 20 50 % de la liaison du réactif R1 (IC_{50}).

Ces tests permettent, de manière non ambiguë, d'associer à chaque molécule HLA II, les séquences des fragments capables de s'y lier ou au contraire qui ne s'y lient pas.

25 Cette démarche permet de définir des compositions immunogènes incluant des peptides qui se lient au plus grand nombre de molécules HLA II différentes et qui peuvent être ainsi avantageusement protectrices pour la majorité des patients, même si l'on ne connaît pas leurs génotype HLA.

Cette démarche a en outre l'avantage de permettre la sélection de peptides significativement plus spécifiques vis-à-vis du VHC que les démarches 30 cherchant à sélectionner des peptides sur la base de leur capacité à stimuler les lymphocytes T CD4+ (tests de prolifération).

Les conditions d'incubation sont propres à chaque molécule HLA II

(temps d'incubation, pH, réactif R1, concentration en HLA II ou en réactif R1).

Le réactif R1 est sélectionné dans le groupe constitué par les séquences suivantes :

- PKYVKQNTLKLAT (HA 306-318, SEQ IDNO: 75), spécifique des allèles
5 DRB1*0101, DRB1*0401, DRB1*1101 et DRB5*0101,
- EAEQLRAYLDGTGVE (A3 152-166, SEQ ID NO: 79), spécifique de l'allèle
DRB1*1501,
- AKTIAYDEEARGLE (MT 2-16, SEQ ID NO: 77), spécifique de l'allèle
DRB1*0301,
- 10 • AAYAAKAAALAA (YKL, SEQ ID NO: 76), spécifique de l'allèle
DRB1*0701,
- TERVRLVTRHIYNREE (B1 21-36, SEQ ID NO: 78), spécifique de l'allèle
DRB1*1301,
- ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT (LOL 191-210, SEQ ID NO: 80), spécifique de
15 l'allèle DRB3*0101,
- AGDLLAIEDTKATI (E2/E168, SEQ ID NO: 81), spécifique de l'allèle
DRB4*0101, et
- EKKYFAATQFEPLAARL (Oxy 271-287, SEQ ID NO: 82) spécifique des allèles
DP*0401 et DP*0402.

- 20 D'autres réactifs R1 peuvent être utilisés, notamment ceux décrits dans Southwood et al. (J. Immunol., 1998, 160, 3363-3373).

La présente invention a également pour objet un vaccin destiné à la prévention et au traitement des infections à VHC, caractérisé en ce qu'il inclut une composition immunogène telle que définie ci-dessus.

- 25 La présente invention a également pour objet des peptides issus de la protéine C ou de la protéine NS3 d'un VHC, notamment de génotype 1a ou 1b, caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par : les peptides issus de la protéine C, tels que définis ci-dessus, à l'exclusion du peptide C 31-45, C 21-40, C 20-44, C 23-42, C 111-130, C 109-128, C 128-152, C 131-150, C 133-152, C 138-
30 162, C 141-155, C 142-161, C 141-160 et C 145-164, et les peptides issus de la protéine NS3 choisis parmi :

- les peptides correspondant respectivement aux positions 1007-1037, 1036-1055, 1052-1072, 1076-1093, 1127-1153, 1149-1172, 1174-1195, 1190-1212, 1206-1239, 1275-1304, 1361-1387, 1377-1403, 1404-1432, 1456-1481, 1495-1513, 1524-1553 et 1552-1583 et les peptides d'au moins 11 acides aminés inclus dans
- 5 les peptides précédents, à l'exclusion des peptides NS3 1384-1401 et NS3 1207-1221,
- les peptides correspondant respectivement aux positions 1246-1260 et 1261-1275,
- les peptides dérivés des peptides précédents par substitution par des résidus alanine (C → A), de résidu(s) cystéine situé(s) en position +1 ou +2,
- 10 relativement au résidu d'acide aminé en position N terminale et/ou en position -1, -2 ou -3, relativement au résidu d'acide aminé en position C terminale, et
- les peptides dérivés des peptides précédents, tels que définis ci-dessus.

De tels peptides qui contiennent un épitope CD4+, apte à avoir une

15 activité de liaison < 1000 nM, de préférence < 800 nM vis-à-vis d'au moins 4 molécules HLA II différentes telles que définies ci-dessus, sont aptes à être reconnus par des lymphocytes T CD4+ spécifiques desdits peptides présents chez des patients infectés par le VHC sont donc utiles comme réactifs de diagnostic d'une infection à VHC.

20 La présente invention a également pour objet un réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins l'un des peptides C ou NS3, tels que définis ci-dessus, lesdits peptides étant éventuellement marqués ou complexés, sous la forme de complexes multimériques.

La présente invention a également pour objet un procédé

25 d'évaluation de l'état immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détection de la présence de cellules T CD4+ spécifiques des peptides C et/ou NS3, tels que définis ci-dessus ; ladite détection est réalisée, de manière avantageuse par l'un des tests suivants : test de prolifération, test ELISPOT [voir par exemple la Demande Internationale WO 99/51630 ou Gahéry-Ségard et al. J. Virol., 2000, 74,

30 1964-]) ou cytométrie de flux en présence de complexes multimériques constitués à partir desdits peptides E6 et/ou E7.

De manière plus précise :

* pour ce qui concerne le test de prolifération :

- Une suspension de cellules (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les peptides sélectionnés selon l'invention ou des lymphocytes T clonés) est cultivée pendant 3 à 5 jours en présence des peptides sélectionnés et au besoin de cellules présentatrices appropriées telles que des cellules dendritiques, des PBMC autologues ou hétérologues, des cellules lymphoblastoïdes telles que celles obtenues après infection par le virus EBV ou des cellules génétiquement modifiées. La prolifération des cellules est mesurée par incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN des cellules.
- 10 Les peptides sélectionnés conformément à l'invention, permettent de révéler dans la suspension initiale la présence de cellules spécifiques de ces peptides.

* pour ce qui concerne le test ELISPOT :

- Le test ELISPOT permet de révéler la présence de cellules T spécifiques d'un peptide sélectionné conformément à l'invention et sécrétant de l'IFN- γ .
- 15 De manière plus précise, les cellules T sont révélées par mesure de la sécrétion d'IFN- γ après incubation des PMBC des patients avec les peptides sélectionnés selon l'invention, conformément à la méthode décrite dans Gahéry-Ségard et al., J. Virol., 2000, 74, 1964.

- * pour ce qui concerne la mise en œuvre de complexes multimériques et notamment de complexes tétramériques :
- 20

- on met en contact un échantillon biologique, de préférence des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) avec des complexes tétramériques marqués produits à partir de complexes entre des peptides C et/ou NS3 tels que définis ci-dessus et des molécules HLA de classe II solubles et l'on
- 25 - analyse les cellules marquées, notamment par cytométrie de flux.
- De manière avantageuse, préalablement à la mise en contact de l'échantillon biologique avec ledit complexe, on l'enrichit en cellules T CD4+, en le mettant en contact avec des anticorps anti-CD4, pour enrichir ledit échantillon.

- Les tétramères sont préparés, comme précisé, par exemple dans E.J. Novak et al. (J. Clin. Investig., 1999, 104, R63-R67) ou dans M.J. Kuroda et al. (J. Virol., 2000, 74, 18, 8751-8756).
- 30

Brièvement, les tétramères sont fabriqués en incubant, pendant 72 heures à 37°C et dans un tampon phosphate citrate 10 mM, NaCl 0,15 M à un pH compris entre 4,5 et 7, des molécules HLA II solubles et biotinylées avec un excès de 10 de peptides C et/ou NS3, identifiés et sélectionnés conformément à l'invention.

- 5 La forme tétramérisée est obtenue en ajoutant à la préparation de la streptavidine marquée par un fluorochrome en quantité quatre fois moindre (mole à mode) que de molécules HLA II. L'ensemble est incubé une nuit à température ambiante.

- 10 Pour utiliser ces tétramères, on met en contact une suspension de cellules (PBMC, PBMC déplétées en cellules CD8+, lymphocytes T préalablement enrichis par une étape de culture *in vitro* avec les peptides C et/ou NS3 sélectionnés conformément à la présente invention ou des lymphocytes T clonés) avec un ou plusieurs tétramères (10 à 20 mg/ml) pendant 1 à 3 heures. Après lavage, la suspension est analysée par cytométrie de flux : on visualise le marquage des cellules par les
- 15 tétramères grâce au fait que ces constructions sont fluorescentes.

La cytométrie de flux permet de séparer les cellules marquées par les tétramères des cellules non marquées et d'effectuer ainsi un tri cellulaire.

- La présente invention a ainsi, en outre, pour objet une méthode de tri de lymphocytes T spécifiques du VHC, caractérisée en ce qu'il comprend au moins les
- 20 étapes suivantes :

- incubation ou mise en contact, d'une suspension de cellules à trier avec un ou plusieurs tétramères marqués formés à partir de complexes entre des peptides C et/ou NS3 tels que définis ci-dessus et des molécules HLA II solubles, et
- tri des cellules marquées par les tétramères.

- 25 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention ainsi qu'au dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre les séquences des peptides issus des protéines C
- 30 et NS3 qui ont été étudiés. Pour simplifier les différents peptides ont été dénommés 1C à 6C et 8N à 29N.

- la figure 2 illustre l'activité de liaison d'une première série de peptides des protéines C et NS3, vis-à-vis des molécules HLA II prépondérantes dans la population caucasienne. Les valeurs correspondent aux IC₅₀, exprimées en nM. Les valeurs inférieures à 1000 nM, correspondant aux peptides présentant une bonne affinité pour les molécules HLA II, sont indiquées en gras. nd : non déterminé.

- la figure 3 illustre l'activité de liaison, vis-à-vis des molécules HLA II prépondérantes dans la population caucasienne, d'une seconde série de peptide des protéines C et NS3, dérivés de la première série. Les valeurs correspondent aux IC₅₀, exprimées en nM. Les valeurs inférieures à 1000 nM, correspondant aux peptides présentant une bonne affinité pour les molécules HLA II, sont indiquées en gras. nd : non déterminé.

- la figure 4 illustre l'immunogénicité *in vivo* de 3 peptides de la protéine NS3 présentant une forte affinité pour HLA-DR1 (8N 1007-1037, 15N 1174-1195 (15N) et 28N 1524-1553, mesurée par un test de prolifération des splénocytes de souris transgéniques pour les molécules HLA-DR1 humaines, préalablement immunisées par chacun des peptides (figure 4A) ou par un mélange de ces peptides (figure 4B). Les peptides 3C 93-107, 6C 148-173 et 12N 1094-1119 qui possèdent une faible affinité pour HLA-DR1 sont utilisés comme contrôle. Les valeurs correspondent à l'index de prolifération des splénocytes.

- la figure 5 illustre l'immunogénicité *in vitro* de 6 peptides de la protéine NS3 présentant une forte affinité pour au moins 4 molécules HLA II différentes prépondérantes dans la population caucasienne (8N 1007-1021, 8N 1019-1033, 15N 1178-1193, 28N 1538-1552, 18N 1250-1264 et 8N 1024-1037), mesurée par un test ELISPOT, à partir de 3 lignées de lymphocytes T CD4+ issues d'un individu séro-négatif (P014/A, P014/B et P014/C) ; les lymphocytes T ont été préalablement stimulés *in vitro* par des cellules dendritiques de ce même individu chargées par le mélange de peptides) puis le nombre de lymphocytes T sécréteurs d'IFN- γ a été mesuré en présence de cellules dendritiques non chargées issues du même individu et en présence de ces peptides seuls ou en mélange (mix HCV) ou bien en l'absence de peptides (- peptide). Les valeurs indiquées correspondent au nombre de lymphocytes T sécréteurs d'IFN- γ .

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE 1 : DETERMINATION DES CONDITIONS DES TESTS DE

5 **LIAISON PEPTIDES/MOLECULES HLA II**

1) Peptides

Tous les peptides sont synthétisés selon la stratégie Fmoc en synthèse parallèle sur phase solide, purifiés par HPLC et contrôlés par spectrométrie de masse (ES-MS).

10 a) Première série de peptides

L'activité de liaison des peptides des protéines C et NS3 du VHC aux molécules HLA II, a été testée à partir de 25 fragments de grandes tailles (entre 15 et 34 acides aminés), choisis selon deux critères :

- présence de plusieurs résidus aromatiques ou hydrophobes qui sont
- 15 les principaux résidus d'ancrage pour les molécules HLA-DR et HLA-DP, et
- bonne probabilité de pouvoir être synthétisés.

Les séquences des peptides sélectionnés, issues du génotype 1a, sont présentées dans le Tableau III ci-dessous.

Tableau III : Séquences de la première série de peptides

nom	Séquence	Taille	numéro
1C 19-47	PQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVR	29	SEQ ID NO: 1
2C 31-57	VGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSERSQ	27	SEQ ID NO: 2
3C 93-107	WAGWLLSPRGSRPSW	15	SEQ ID NO: 3
4C 104-133	RPSWGPDPRRSRNLGKVIDILTCGFADL	30	SEQ ID NO: 4
5C 127-149	TAGFADLMGYIPLVGAPLGGAAR	23	SEQ ID NO: 5
6C 148-173	ARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGAS	26	SEQ ID NO: 6
8N 1007-1037	GREILLGPADGMVSKGWRLAPITAYAQQTR	31	SEQ ID NO: 7
9N 1036-1055	TRGLLGCIITSLTGRDKNQV	20	SEQ ID NO: 8
10N 1052-1072	KNQVEGEVQIVSTAAQTFLAT	21	SEQ ID NO: 9
11N 1076-1093	GVAWTVYHGAGRTIASP	18	SEQ ID NO: 10
12N 1094-1119	KGPVIQMYTNVDQDLVGWPAPOGSR	26	SEQ ID NO: 11
13N 1127-1153	SSDLYLVTTRHADVIPVRRRGDSRGSL	27	SEQ ID NO: 12
14N 1149-1172	RGSLSPRPISYLGSSGGPLLAP	24	SEQ ID NO: 13
15N 1174-1195	GHAUVGIFRAAVCTRGVAKAVDF	22	SEQ ID NO: 14
16N 1190-1212	AKAVDFIPVENLETTMRSPVFTD	23	SEQ ID NO: 15
17N 1206-1239	RSPVFTDNSSFPVVSQFVAHLHAPTGSOKSTK	34	SEQ ID NO: 16
18N 1246-1275	AQGYKVLVLPNSVAATLFGGAYMSKAHGD	30	SEQ ID NO: 17
19N 1275-1304	DPNIRTGVRTITITGSPITYSTYKFLADGG	30	SEQ ID NO: 18
22N 1362-1387	IEEVALSTTGIEPFYFGKAIPLEVIKG	26	SEQ ID NO: 19
23N 1377-1403	GKAIPLEVIKGRRHLIFCHSKKKADEL	27	SEQ ID NO: 20
24N 1404-1432	AAKLVALGQNAVAYYRGLDVSVIPTSGDV	29	SEQ ID NO: 21
26N 1456-1481	TAVTQTVDFSLDPTFTIETITLQDA	26	SEQ ID NO: 22
27N 1495-1513	KPGIYRFVAFGERPSGMFD	19	SEQ ID NO: 23
28N 1524-1553	GAAWYELTPAETTVRLRAYMNTPLPVAQD	30	SEQ ID NO: 24
29N 1552-1583	QDHLEFWEGVFTGLTHIDAHFLSOTKQSGENL	32	SEQ ID NO: 25

* les résidus alanine correspondant à la substitution d'un résidu cystéine de la séquence de la polyprotéine du VHC sont indiqués en gras.

b) deuxième série de peptides

- 5 Tous les peptides de la première série se liant à au moins 6 molécules HLA II et certains peptides se liant à au moins 5 molécules HLA II ont été découpés en peptides de 15 acides aminés afin d'identifier plus précisément les zones d'interaction (peptides 8N, 9N, 10N, 15N, 16N, 18N, 19N, 23N, 27N, 28N, 29N, 1C, 2C et 5C). Seul le peptide 26 n'a pas été étudié en raison de la difficulté à le synthétiser.
- 10 Le peptide 6C qui est très chevauchant avec le peptide 5C et qui en combinaison avec ce dernier se lie à 6 molécules HLA II a également été étudié.

La séquence de l'ensemble de ces peptides est présentée dans le Tableau IV et la figure 1.

Tableau IV : Séquences de la deuxième série de peptides

nom	Séquence	numéro
8N 1007-1037	GREILLGPADGMVSKGWRLAPITAYAAQOTR	SEQ ID NO: 7
8N 1007-1021	GREILLGPADGMVSK	SEQ ID NO: 26
8N 1011-1025	LLGPADGMVSKGWRL	SEQ ID NO: 27
8N 1015-1029	ADGMVSKGWRLAPI	SEQ ID NO: 28
8N 1019-1033	VSKGWRLAPITAYA	SEQ ID NO: 29
8N 1020-1034	SKGWRLAPITAYAQ	SEQ ID NO: 30
8N 1024-1037	RLAPITAYAAQOTR	SEQ ID NO: 31
15N 1174-1195	GHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDF	SEQ ID NO: 14
15N 1174-1188	GHAVGIFRAAVCTRG	SEQ ID NO: 32
15N 1178-1192	GIFRAAVCTRGVAKA	SEQ ID NO: 33
15N 1181-1195	RAAVCTRGVAKAVDF	SEQ ID NO: 34
28N 1524-1553	GAAWYELTPAETTVRLRAYMNTPLPVAQD	SEQ ID NO: 24
28N 1524-1538	GAAWYELTPAETTVR	SEQ ID NO: 35
28N 1528-1542	YELTPAETTVRLRAY	SEQ ID NO: 36
28N 1529-1543	ELTPAETTVRLRAYM	SEQ ID NO: 37
28N 1534-1548	ETTVRLRAYMNTPL	SEQ ID NO: 38
28N 1538-1552	RLRAYMNTPLPVAQ	SEQ ID NO: 39
28N 1540-1553	RAYMNTPLPVAQD	SEQ ID NO: 40
18N 1246-1275	AQGYKVLVLNPSVAATLFGGAYMSKAHGID	SEQ ID NO: 17
18N 1246-1260	AQGYKVLVLNPSVAA	SEQ ID NO: 41
18N 1250-1264	KVLVLNPSVAATLGF	SEQ ID NO: 42
18N 1255-1269	NPSVAATLFGGAYMS	SEQ ID NO: 43
18N 1261-1275	TLFGGAYMSKAHGD	SEQ ID NO: 44
1C 19-47	PQDVKFFGGQIVGGVYLLPRRGPRLGVR	SEQ ID NO: 1
2C 31-57	VGGVYLLPRRGPRLGVRATRKTSERSQ	SEQ ID NO: 2
1C 19-33	PQDVKFFGGQIVGG	SEQ ID NO: 45
1C 27-41	GGGQIVGGVYLLPRRG	SEQ ID NO: 46
2C 31-45	GGVYLLPRRGPRLGVR	SEQ ID NO: 47
2C 43-57	RLGVRATRKTSERSQ	SEQ ID NO: 48
5C 127-149	TAGFADLMGYIPLVGAPLGGAAR	SEQ ID NO: 5
6C 148-173	ARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGAS	SEQ ID NO: 6
5C 127-141	TAGFADLMGYIPLVG	SEQ ID NO: 49
5C 131-145	ADLMGYIPLVGAPLG	SEQ ID NO: 50
5C 134-148	MGYIPLVGAPLGGA	SEQ ID NO: 51
C 141-155	GAPLGGAARALAHG	SEQ ID NO: 52
6C 148-163	ARALAHGVRVLEDGV	SEQ ID NO: 53
6C 152-166	AHGVRVLEDGVNYAT	SEQ ID NO: 54
6C 159-173	EDGVNYATGNLPGAS	SEQ ID NO: 55
16N 1190-1212	AKAVDFIPVENLETTMRSPVFTD	SEQ ID NO: 15
16N 1190-1204	AKAVDFIPVENLETT	SEQ ID NO: 56
16N 1192-1206	AVDFIPVENLETTMR	SEQ ID NO: 57
16N 1196-1210	IPVENLETTMRSPVF	SEQ ID NO: 58
16N 1199-1212	ENLETTMRSPVFTD	SEQ ID NO: 59
10N 1052-1072	KNQVEGEVQIVSTAAQTFLAT	SEQ ID NO: 9
10N 1052-1066	KNQVEGEVQIVSTAA	SEQ ID NO: 60
10N 1056-1070	EGEVQIVSTAAQTF	SEQ ID NO: 61
23N 1377-1403	GKAIPLEVIKGGRIHIFCHSKKKKADEL	SEQ ID NO: 20
23N 1377-1391	GKAIPLEVIKGGRIH	SEQ ID NO: 62
23N 1381-1395	PLEVIKGGRIHIFCH	SEQ ID NO: 63
23N 1383-1397	EVIKGGRIHIFCHSK	SEQ ID NO: 64
23N 1389-1403	RHIFCHSKKKKADEL	SEQ ID NO: 65
27N 1495-1513	KPGIYRFVAPGERPFGMFD	SEQ ID NO: 23

27N 1495-1509	KPGIYRFVAPGERPS	SEQ ID NO: 66
27N 1500-1513	RFVAPGERPSGMFD	SEQ ID NO: 67
29N 1552-1583	QDHLEFWEGVFTGLTHIDAHFLSQTQSGENL	SEQ ID NO: 25
29N 1554-1568	HLEFWEGVFTGLTHI	SEQ ID NO: 68
29N 1565-1579	LTHIDAHFLSQTQKS	SEQ ID NO: 69
29N 1559-1573	EGVFTGLTHIDAHFL	SEQ ID NO: 70
29N 1563-1577	TGLTHIDAHFLSQTK	SEQ ID NO: 71
29N 1569-1583	DAHFLSQTQSGENL	SEQ ID NO: 72
9N 1036-1055	TRGLLGCIITSLTGRDKNQV	SEQ ID NO: 8
9N 1036-1050	RGLLGCIITSLTGRD	SEQ ID NO: 73
9N 1041-1055	GCIITSLTGRDKNQV	SEQ ID NO: 74
19N 1275-1304	DPNIRTGVRTITITGSPITYSTYVKFLADGG	SEQ ID NO: 18
19N 1275-1289	DPNIRTGVRTITITGS	SEQ ID NO: 83
19N 1279-1293	RTGVRTITITGSPITY	SEQ ID NO: 84
19N 1283-1297	RTITITGSPITYSTYG	SEQ ID NO: 85
19N 1290-1304	PITYSTYVKFLADGG	SEQ ID NO: 86

2) Molécules HLA II

a) Choix des allèles

- 12 molécules HLA II (10 molécules HLA-DR et 2 molécules HLA-DP) les plus abondantes dans la population française et dont les fréquences alléliques sont caractéristiques de la population caucasienne, ont été sélectionnées (Tableau VIII):

- molécules HLA-DR dont la chaîne β est codée par le gène DR1

- Il s'agit des molécules HLA-DR1, -DR3, -DR4, -DR7, -DR11, -DR13 et -DR15 dont la chaîne β est codée par les allèles du locus DRB1 dont la fréquence dépasse les 5 % dans la population française : DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301 et DRB1*1501 qui représentent à eux seuls 64 % de la population. Ces mêmes allèles sont les allèles HLA-DR les plus abondants dans les autres populations caucasiennes. Leur fréquence varie entre 53 % (en Espagne) et 82 % (au Danemark). Pour les Etats-Unis et le Canada, ils représentent respectivement 58 et 55 % des allèles DR de la population.

- molécules HLA-DR dont la chaîne β n'est pas codée par le gène DR1

- Il s'agit des molécules HLA-DRB3, -DRB4 et -DRB5 dont la chaîne β est codée par les allèles les plus fréquents dans la population française : HLA-DRB3*0101 (9,2 %), HLA-DRB4*0101 (28,4 %), et HLA-DRB5*0101 (7,9 %). Ces molécules couvrent à elles seules 45 % de la fréquence allélique.

- molécules HLA-DP

Il s'agit des molécules HLA-DP4 qui regroupent les molécules

codées par les allèles DPB1*0401 et DPB1*0402. Ces molécules DP4 sont les molécules HLA II les plus abondantes en Europe et aux Etats Unis. Leur fréquence allélique est en effet de 40 et 11 % respectivement ce qui signifie qu'elles sont l'une ou l'autre trouvées chez environ 76% des individus.

- 5 Les peptides présents dans une séquence protéique et qui lient l'ensemble de ces molécules incluent donc les épitopes T CD4⁺ de la majorité de la population.

b) purification des molécules HLA II

- 10 Les molécules HLA II sont purifiées par immunoaffinité à partir de différentes lignées homozygotes de lymphocytes B humains transformées par le virus Epstein Barr (EBV).

L'origine des lignées EBV et les différents allèles qui les caractérisent sont décrits dans les Tableaux V et VI ci-dessous .

Tableau V : Spécificité DR des lignées EBV

Lignées	Spécificité	Allèle DRB1	Autres Allèles DRB
LG2*	DR1	DRB1*0101	
HOM2	DR1	DRB1*0101	
SCHU	DR15	DRB1*1501	DRB5*0101
MAT*	DR3	DRB1*0301	DRB3*0101
STEILIN	DR3	DRB1*0301	DRB3*0101
BOLETH [°]	DR4	DRB1*0401	DRB4*0101
PREISS [°]	DR4	DRB1*0401	DRB4*0101
PITOUT [°]	DR7	DRB1*0701	DRB4*0101
SWEIG [°]	DR11	DRB1*1101	DRB3*0202
HHKB ^{°°}	DR13	DRB1*1301	DRB3*0101

[°] Strang et al. J. Gen Virol., 1990, 71, 423, ^{°°} Tsukui et al., Cancer Res., 1996, 56, 3967

Tableau VI : Lignées EBV exprimant DP4

Lignées	Spécificité DP	Allèle DPA1	Allèle DPB1	référence
HOM2	DP4	DPA1*0103	DPB1*0401	^o
BOLETH	DP4	DPA1*0103	DPB1*0401	^o
PITOUT	DP4	DPA1*0103	DPB1*0401	SOUTHWOOD et al., J. Immunol., 1998, 160, 3363-3373
HHKB	DP4	DPA1*0103	DPB1*0401	DAVENPORTH et al, P.N.A.S., 1995, 92, 6567.
SHU	DP4	DPA1*0103	DPB1*0402	^o
MLF	DP4	DPA1*0103	DPB1*0402	^o
BM92	DP4	DPA1*0103	DPB1*0402	^o

^o l'origine des lignées est décrite sur le site internet de la Collection européenne de Culture Cellulaire (<http://fuseiv.co.uk/camr/>)

Les molécules HLA-DR et HLA-DP sont immunopurifiées au moyen

- 5 des anticorps monoclonaux respectivement L243 (Smith et al., *P.N.A.S.*, 1982, 79, 608-612) et B7/21 (WATSON et al., *Nature*, 1983, 304, 358-361), selon les protocoles décrits dans Texier et al. (*J. Immunol.*, 2000, 164, 3177 ; *Eur. J. Immunol.*, 2001, 31, 1837).

3) Tests de liaison HLA II/peptides

10 a) principe des tests

Les tests de liaison des peptides aux molécules HLA-DP et HLA-DR sont des tests en compétition avec une révélation immuno-enzymatique, dérivés de ceux mis au point pour des molécules HLA-DR (HLA-DR1: MARSHALL et al., *J. Immunol.*, 1994, 152, 4946- ; HLA-DR1, -DR2, -DR3, -DR4, -DR7, -DR11 et -DR13

15 : Demande de Brevet FR 99 0879 et TEXIER et al., précités).

Les tests de liaison sont réalisés de la manière suivante: les molécules HLA-DR ou HLA-DP sont diluées dans des plaques à 96 puits en polypropylène, dans du tampon phosphate 10mM, NaCl 150 mM, dodécyl maltoside (DM) 1 mM, citrate 10 mM, thimérosal 0,003%, à un pH et une dilution appropriés pour

20 chaque molécule. Un peptide traceur biotinylé (Tableau VIII) est ajouté à une concentration donnée, ainsi que plusieurs concentrations de peptides à tester (peptide compétiteur). A la fin de l'incubation à 37°C (entre 24 et 72 heures selon les molécules), les échantillons sont neutralisés avec 50 µL de tampon Tris HCl 450 mM, pH 7,5, thimérosal 0,003 %, BSA 0,3 %, DM 1 mM. Ils sont ensuite transférés sur des

25 plaques ELISA maxisorp (96 puits) sur lesquels les anticorps anti-DP ou anti-DR ont été préalablement adsorbés. L'incubation des échantillons sur ces plaques est réalisée

- pendant deux heures à température ambiante. Des lavages sont effectués entre chaque étape en tampon Tris HCl 0,1M, pH 7,5, Tween-20 0,05%. Le peptide biotinylé lié aux molécules HLA II est détecté par l'addition de 100 µL/puits du conjugué streptavidine-phosphatase alcaline (45 minutes) dilué au 1/2000 dans le tampon Tris 10mM, pH 7, NaCl 0,15M, Tween 20 0,05%, BSA 0,2%, thimérolal 0,003%, puis de 200 µL/puits du substrat 4-méthyl-umbelliferyl-phosphate (MUP) à la concentration de 100 µM, en tampon NaHCO₃ 0,05M, pH 9,8, MgCl₂ 1mM. L'émission de fluorescence par le produit de la réaction enzymatique est mesurée à 450 nm après excitation à 365 nm. La liaison maximale est déterminée en incubant le peptide traceur biotinylé avec la molécule HLA II en l'absence de peptide compétiteur. La spécificité de liaison est contrôlée par l'addition d'un excès de peptide non biotinylé. Le bruit de fond obtenu ne diffère pas significativement de celui obtenu en incubant le peptide biotinylé sans les molécules HLA II. Les résultats sont exprimés sous la forme de la concentration de peptide compétiteur qui inhibe 50% de la liaison maximale du peptide traceur biotinylé (IC₅₀).

b) Conditions et sensibilité des tests

Pour chaque test de liaison, la concentration en molécules HLA II, la concentration du peptide traceur, le pH d'incubation et le temps d'incubation ont été optimisés comme précisé dans le Tableau VII ci-après.

20 **TABLEAU VII : Conditions des tests de liaison aux molécules HLA II**

Allèles	dilution	Traceurs	Concentration traceur (nM)	pH optimal	Temps d'incubation (h)
DRB1*0101	1/40 à 1/400	HA 306-318	1	6	24
DRB1*0301	1/10 à 1/40	MT 2-16	200	4,5	72
DRB1*0401	1/20 à 1/100	HA 306-318	30	6	24
DRB1*0701	1/20 à 1/100	YKL	10	5	24
DRB1*1101	1/20 à 1/100	HA 306-318	20	5	24
DRB1*1301	1/10 à 1/40	B1 21-36	200	4,5	72
DRB1*1501	1/10 à 1/100	A3 152-166	10	4,5	72
DRB5*0101	1/10 à 1/100	HA 306-318	10	5,5	24
DRB3*0101	1/10 à 1/100	Loi 191-120	10	5,5	24
DRB4*0101	1/10 à 1/100	E2/E168	10	5	72
DBP1*401	1/20 à 1/400	Oxy 271-287	10		24
DPB1*402	1/20 à 1/100	Oxy 271-287	10		24

La sensibilité de chaque test est reflétée par les IC_{50} observées avec les peptides non-biotinylés qui correspondent aux traceurs et les résultats obtenus sont illustrés au Tableau VIII ci-après.

Tableau VIII : Sensibilité des tests de liaison au molécules HLA II prépondérantes dans la population caucasienne

5

Allèles	Fréquence	Peptides	Séquences (SEQ ID NO: 75 à 82)	IC_{50} (nM)
DRB1*0101	9,3	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	31
DRB1*0401	5,6	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	44
DRB1*1101	9,2	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	38
DRB1*0701	14,0	YKL	AAYAAAKAAALAA	34
DRB1*0301	10,9	MT 2-16	AKTIAYDEEARRGLE	100
DRB1*1301	6,0	B1 21-36	TERVRLVTRHIVNREE	330
DRB1*1501	8,0	A3 152-166	EAEQLRRAYLDGTGVE	14
DRB5*0101	7,9	HA 306-318	PKYVKQNTLKLAT	6,5
DRB3*0101	9,2	LoI 191-120	ESWGAVWRIDTPDKLTGPFT	5
DRB4*0101	28,4	E2/E168	AGDLLAIEDTKATI	2
DPB1*401	40	Oxy 271-287	EKKYFAATQFEPLAARL	10
DPB1*402	11	Oxy 271-287	EKKYFAATQFEPLAARL	10

Les fréquences indiquées, issues de Colombani (HLA: fonctions immunitaires et applications médicales. 1993. Eds John Libbey Eurotext), qui sont les fréquences alléliques en France, sont représentatives de celles de la population caucasienne.

EXEMPLE 2 : ACTIVITES DE LIAISON DES PEPTIDES C et NS3 VIS-A-VIS DES MOLECULES HLA II PREPONDERANTES DANS LA POPULATION CAUCASIENNE.

1) Première série de peptides (figure 2)

L'activité de liaison des peptides longs tels que définis à l'exemple 1, vis à vis des 12 molécules HLA II prépondérantes dans la population caucasienne (HLA-DR1, -DR3, -DR4, -DR7, -DR11, -DR13, -DR15, -DRB3, -DRB4, -DRB5, -DP401, et -DP402 ; tableau VIII) a été mesurée dans les conditions précisées à l'exemple 1.

Les résultats illustrés par la figure 2 montrent que chaque peptide se lie avec une bonne affinité ($IC_{50} < 1000$ nM) à au moins une molécule HLA II et que plusieurs peptides se lient avec une bonne affinité à plusieurs molécules HLA II. Parmi ces derniers, les peptides 26N, 8N, 28N, 1C, 10N, 15N, 19N, 29N, 2C, 16N,

18N, 23N, 27N, 5C, 9N, 11N, 13N, 14N, 17N, 24N, 4C et 22N se lient avec une bonne affinité à au moins 4 molécules HLA II différentes.

2) Deuxième série de peptides (figures 3 et Tableau IX)

- Les résultats illustrés par la figure 3 et le Tableau IX permettent de préciser les zones d'interaction des peptides avec les différentes molécules HLA II.

Tableau IX: Activités de liaison des peptides 9N et 29N vis-à-vis des molécules

HLA II prépondérantes dans la population caucasienne.

	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5
9N 1036-1065	51	>100000	950	2600	700	>100000	5500		1000	53
9N 1036-1050	16	>100000	350	2500	1100	>100000	1550		300	2000
9N 10411055	190	62500	2900	25000	2600	>100000	525		65000	11
29N 1552-1583	170	6750	4000	750	90	27333	60		25000	333
29N 1559-1573	29	>100000	3000	18	7	>100000	305		>100000	32
29N 1563-1577	8	3900	2100	16	817	3250	13		40000	12
29N 1569-1583	950	>100000	10500	3000	22	>100000	2800		>100000	21000

EXEMPLE 3 : IMMUNOGENICITE DE PEPTIDES NS3 *IN VIVO* CHEZ DES SOURIS TRANSGENIQUES POUR UNE MOLECULE HLA II

- La capacité des peptides ayant une bonne affinité pour les molécules HLA II tels que définis ci-dessus à induire une réponse immunitaire, a été évaluée par un test de prolifération *in vitro*, chez des souris transgéniques pour les molécules HLA-DR1 (Wilkinson et al., Infect. Immunity, 1999, 67, 1501-; Rosloniec et al., J. Exp. Med., 1997, 185, 1113-), préalablement immunisés avec ces peptides.

- Plus précisément, le protocole utilisé est le suivant : 25 µg de chacun des peptides 8N 1007-1037, 15N 1174-1195, 28N 1524-1553, 3C 93-107, 6C 148-173 et 12N 1094-1119, séparément, ou bien 10 µg et 25 µg d'un mélange des mêmes peptides 8N, 15N et 28N ont été émulsifiés dans du montanide et injectés, par voie sous-cutanée, à un groupe de 5 souris. 15 jours après, une deuxième injection a été effectuée dans les mêmes conditions. Dix jours après cette deuxième injection, les animaux ont été sacrifiés et leur rate prélevée. Les splénocytes ont été mis en culture dans du milieu IHL-1 (BIOWHITTAKER) supplémenté par 1% de sérum de souris, en présence de 5 µg/ml de chacun des peptides utilisés pour l'injection, ou en l'absence de peptide. Après 4 jours de culture, 1 µCi de thymidine tritiée (AMERSHAM, LIFE TECHNOLOGIE) a été rajoutée pendant 16 h. L'incorporation de la thymidine tritiée a ensuite été mesurée à l'aide d'un compteur bêta (microbêta 1450, PERKIN

ELMER). Les résultats sont exprimés en index de prolifération (nombre de CPM en présence de peptide/nombre de CPM en l'absence de peptide).

Les résultats montrent que les peptides 8N1007-1037, 15N 1174-1195 et 28N 1524-1553 qui possèdent une forte capacité de liaison à la molécule HLA-DR1 (IC₅₀ de respectivement 2, 3 et 2 nM) induisent une forte réponse immunitaire chez ces souris alors que les peptides 3C93-107, 6C148-173 et 12N1094-1119 qui possèdent une faible capacité de liaison à cette molécule (IC₅₀ de respectivement 6333, 10000 et > 10000 nM) n'induisent pas d'effet (figure 4A). Ces résultats montrent également que l'injection d'un mélange de peptides n'a pas d'effet délétère sur la réponse immunitaire et permet d'induire une forte réponse contre chacun des peptides du mélange (figure 4B).

Ces résultats confirment que les peptides sélectionnés par le test de liaison aux molécules HLA II sont capables d'induire une forte réponse CD4+ chez les individus immunisés. Ils indiquent donc que les peptides sélectionnés peuvent être utilisés dans des compositions immunogènes pour la vaccination contre l'hépatite C.

EXEMPLE 4 : IMMUNOGENICITE DE PEPTIDES NS3 IN VITRO

La capacité des peptides ayant une bonne affinité pour les molécules HLA II à induire *in vitro* une stimulation de lymphocytes T spécifiques a été évaluée à partir de prélèvements sanguins de personnes séronégatives pour le VHC. Il s'agit d'évaluer la capacité à recruter des lymphocytes précurseurs CD4+ alors qu'ils sont chez un individu naïf à une très faible fréquence c'est-à-dire d'effectuer une immunisation *in vitro* au moyen de ces peptides.

a) Matériels et méthodes

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) ont été séparées sur un gradient de Ficoll. Les PBMCs ont ensuite été mises en culture dans du milieu AIM V (LIFE TECHNOLOGIES) et incubées dans des flasques, à l'étréve à 37°C en présence de 5% CO₂. Après une nuit d'incubation, les cellules non adhérentes ont été récupérées, déposées sur une colonne LS+ (MYLTENYD), puis les lymphocytes T CD4+ ainsi purifiés ont été congelés. Les cellules adhérentes ont été incubées pendant 5 jours, dans du milieu AIM V contenant 1000U/ml de GM-CSF et 1000U/ml d'IL-4, puis les cellules différenciées en cellules dendritiques ont ensuite été cultivées

pendant 2 jours, en présence de 1 µg/ml de LPS, 1000 U/ml d'IL-4 et 1000 U/ml de GM-CSF, de manière à induire leur maturation.

Les cellules dendritiques matures (100 000 cellules/puits) ont alors été incubées avec un mélange de peptides (10 µg de chaque peptide), pendant 5 heures à 37°C. Les cellules dendritiques matures ont ensuite été lavées puis incubées, en présence des lymphocytes T CD4+ (100 000 cellules/puits) préalablement décongelés, dans du milieu contenant 1000 U/ml d'IL-6 et 10ng/ml d'IL-12. Après 7 jours, la culture a été restimulée une première fois, au moyen de cellules dendritiques matures préalablement décongelées et chargées par le mélange de peptides, dans du milieu contenant de l'IL-2 (10 U/ml) et de l'IL-7 (5ng/ml). 7 jours plus tard, la culture a été restimulée, de façon similaire, dans un milieu ne contenant pas d'IL-2. Après deux stimulations supplémentaires, dans les conditions précédentes, les cellules ont été testées en ELISPOT, de la façon suivante :

Des anticorps anti-IFN γ (1-D1K, MABTECH) dilués à 1 µg/ml dans du tampon PBS ont été adsorbés sur des plaques de nitrocellulose (MILLIPORE) pendant 1 heure à 37°C. Les plaques ont ensuite été lavées avec du PBS puis saturées avec du milieu RPMI contenant 10 % SVF (100µl/puits), pendant 2 h à 37 °C. Les cellules dendritiques matures préalablement décongelées (10000 cellules/puits) et 10 000 lymphocytes à tester ont ensuite été ajoutés dans les plaques et incubées 24 h à 37 °C, en présence ou en l'absence d'un seul peptide ou d'un mélange de peptides. Après un lavage avec du tampon PBS puis avec du PBS Tween 0,05%, 100 µl d'anticorps secondaire anti-IFN-γ conjugué à la biotine (7-B6-1-biotin, MABTECH), dilué à 1 µg/ml dans du PBS contenant 0,05% Tween 20 et 1% BSA, a été ajouté dans chaque puits. Après une heure d'incubation, les plaques ont été lavées à nouveau et incubées avec 100µl/puits d'Extravidin-AKP (n° 2636, SIGMA,), diluée au 1/5000 dans du PBS contenant 0,05 % Tween 20 et 1 % BSA. La révélation de la réaction immunoenzymatique a ensuite été réalisée à l'aide du kit n° 170-6432 (BIORAD)

b) Résultats

Les PBMC d'un patient séronégatif (P014) ont été testées selon le protocole tel que défini ci-dessus, avec le mélange des peptides suivants : 8N 1007-1021, 8N 1019-1033, 15N 1178-1192, 28N 1538-1552, 18N 1250-1264 et 8N 1024-1037.

Après 4 restimulations, un ELISPOT a été réalisé sur différents puits. Trois lignées spécifiques ont pu être mises en évidence (figure 5). Ces trois lignées répondent en présence du mélange de peptides (mix) mais pas en l'absence du mélange. Chaque lignée répond à au moins un des peptides du mélange. La lignée P014/A répond au peptide 15N 172-186 et au peptide 18N 244-258 (figure 5A). La lignée P014/B répond au peptide 8N 13-27 (figure 5B) et la lignée P014/C aux peptides 15N 172-186 et 28N 532-546 (figure 5C).

EXEMPLE 5 : DETECTION DE LYMPHOCYTES T SPECIFIQUES DU VHC A L'AIDE DES PEPTIDES C ET NS3.

La capacité des peptides possédant une affinité élevée pour les molécules HLA de classe II tels que définis ci-dessus, à détecter des lymphocytes T spécifiques du virus de l'hépatite C (VHC), a été testée *in vitro* par le dosage des cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4 et IL-10 produites par les lymphocytes T issus de PBMC de patients infectés de façon chronique par le VHC.

De manière plus précise, les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC) de patients infectés de façon chronique par le VHC ont été séparées sur gradient de Ficoll, à partir d'un prélèvement sanguin hépariné. Les PBMC isolées ont ensuite été cultivées à 37°C, dans des plaques à 96 puits contenant du milieu RPMI 1640 (GIBCO) complet (10 % sérum humain 10 %, 100

UI/ml pénicilline et 10 μ g/ml streptomycine), seul ou en présence :

- d'un mélange des peptides C 19-47 et 31-57, d'un mélange des peptides C 127-149 et 148-173 ou des peptides NS3 1007-1037, 1036-1055, 1074-1195, 1190-1212, 1377-13403, 1524-1553, 1552-1583, chacun à la concentration de 10 μ g/ml,

- d'un mélange de l'ensemble de ces peptides, chacun à la concentration de 110 μ g/ml, 55 μ g/ml ou 11 μ g/ml, ou

- de phytohémagglutinine (PHA) ou de toxine tétanique (TT), chacune à la concentration de 2,5 μ g/ml .

Les surnageants de culture ont été récoltés à 24h ou 48h et stockés à -80 °C jusqu'à l'analyse.

Les cytokines éventuellement présentes dans les surnageants ont été dosées de la façon suivante :

Des plaques à 96 puits (Maxisorp, NUNC) ont été recouvertes de 100 µl d'anticorps anti-IFN-γ, IL-2, IL-4 et IL-10 (BECTON DICKINSON, 2µg/ml) dans du tampon carbonate 0,1M, pH 8, 6 et incubées 2h à 37°C. Après trois lavages successifs avec du tampon PBS contenant 0,05 % de Twen 20, les

5 plaques ont été saturées avec 200 µl de PBS contenant 3 % de sérum albumine bovine (BSA, SIGMA), pendant 2h à température ambiante. 50 µl de surnageant de culture (en double), ainsi qu'une gamme étalon de cytokines recombinantes humaines (rIFN-γ, rIL-2, rIL-4 et rIL-10 ; BECTON DICKINSON) ont ensuite été ajoutés dans chaque puits et les plaques ont été incubées pendant 12h à

10 + 4°C. Après trois lavages successifs avec du tampon PBS contenant 0,05 % de Twen 20, 100 µl d'anticorps secondaires anti-IFN-γ, IL-2, IL-4 et IL-10 (BECTON DICKINSON, 1µg/ml) dans du tampon PBS contenant 1 % de BSA ont été ajoutés dans les puits puis les plaques ont été incubées 1h à température ambiante. Après quatre lavages successifs avec du tampon PBS contenant 0,05 % de Twen 20, 100

15 µl de streptavidine-peroxydase (SIGMA) diluée au 1/10000 dans du tampon PBS contenant 0,1 % BSA ont été ajoutés dans les puits, puis les plaques ont été incubées 30 min à température ambiante. Après quatre lavages successifs avec du tampon PBS contenant 0,05 % de Twen 20, 100 µl d'orthophényldiamine (OPD, SIGMA, 400 µg/ml) dans du tampon citrate 50 mM ont été ajoutés dans les puits et

20 les plaques ont été incubées à température ambiante, puis la réaction a été stoppée par ajout de 50 µl d'HCl 2N. La densité optique a ensuite été mesurée à 540 nM et l'analyse quantitative des cytokines a été réalisée à l'aide du logiciel Deltasoft (DS3-1.518F/1994 E. BERCHTOLD & BIOMETALLICS INC). Les résultats, exprimés en pg/ml, sont présentés au Tableau X.

Tableau X: Dosage de cytokines produites par les lymphocytes T de patients infectés chroniques, après stimulation par les peptides C et NS3, seuls ou en mélange.

		-	PHA	TT	M110	M55	M11	1C + 2C	5C + 6C	8N	9N	15N	16N	23N	28N	29N
patient 815	IL2	-	1002	610	-	-	-	-	-	-	-	-	72	58	-	-
	IFN γ	-	1979	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL4	-	5638	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL10	-	497	-	79	27	-	11*	-	-	156	-	123	63*	-	-
patient 829	IL2	-	NT	6	3	3	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IFN γ	-	441	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL4	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	67	-
	IL10	-	NT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
patient 342	IL2	-	125	22	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IFN γ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL10	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
patient 862	IL2	-	60	-	4	8*	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IFN γ	-	9902	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL4	-	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	57
	IL10	-	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
patient 093	IL2	-	1402*	171	7	8	7	-	2	-	-	-	5	-	-	-
	IFN γ	-	8542	83	-	-	-	-	137	-	-	-	-	57	-	-
	IL4	-	127	24	-	-	-	-	8	35	-	-	-	23	11	44
	IL10	-	8551	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
patient 067	IL2	-	1337	695	136	130	159	-	100	-	-	-	85	51	76	60
	IFN γ	-	2447	212	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL4	-	832	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL10	-	665	-	-	-	40	-	32	43	58	55	-	-	86	31*
patient 630	IL2	-	18874	55	82	2,4	3,4	-	12*	-	-	-	-	-	-	2,4*
	IFN γ	-	474	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL4	-	251	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL10	-	242	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
patient 078	IL2	-	207	48	-	-	44	-	-	-	-	-	17	-	-	-
	IFN γ	-	2249	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL4	-	55	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL10	-	207	-	64	109	85	-	64	16	41	58	43	-	54	21 38
patient 659	IL2	-	153	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	18	-	-
	IFN γ	-	187	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL4	-	453	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	IL10	-	182	-	120	40	-	-	31	-	18	-	-	29	-	-

* dosage à 24h au lieu de 48 h : NT: non testé; - : non détecté

- 5 Le Tableau X montre que 8 patients sur 9 présentent des cellules spécifiques d'au moins un des peptides C ou NS3, sécrétrices d'IL-2, IFN- γ , d'IL-4 ou d'IL-10. Il montre également qu'un mélange de peptides C et NS3 permet de détecter des lymphocytes T spécifiques du VHC au moins aussi efficacement que les peptides utilisés séparément, et qu'il augmente même la sensibilité de cette
- 10 détection (voir patient 342).

Ces résultats indiquent que les peptides ayant une bonne affinité pour les molécules HLA II tels que définis ci-dessus, peuvent être utilisés dans un test de diagnostic de l'état immunitaire de patients vis-à-vis de l'infection par le VHC.

REVENDICATIONS

1°) Mélange de peptides, caractérisé en ce qu'il inclut au moins deux peptides différents issus du virus de l'hépatite C, dont l'un au moins est un peptide issu de la protéine C, se liant à au moins quatre molécules HLA II différentes dont la fréquence allélique est supérieure à 5 % dans la population caucasienne, avec une activité de liaison < 1000 nM.

2°) Mélange de peptides selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il inclut, outre ledit peptide issu de la protéine C, au moins un peptide issu de la protéine NS3, se liant à au moins quatre molécules HLA II différentes dont la fréquence allélique est supérieure à 5 % dans la population caucasienne, avec une activité de liaison < 1000 nM.

3°) Mélange de peptides selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que les dites molécules HLA II sont choisies parmi les molécules HLA-DR1, HLA-DR3, HLA-DR4, HLA-DR7, HLA-DR11, HLA-DR13, HLA-DR15, HLA-DRB3, HLA-DRB4, HLA-DRB5 et HLA-DP4.

4°) Mélange de peptides selon la revendication 3, caractérisé en ce que les dites molécules HLA II sont codées respectivement par les allèles HLA DRB1*0101, DRB1*0301, DRB1*0401, DRB1*0701, DRB1*1101, DRB1*1301, DRB1*1501, DRB3*0101, DRB4*0101, DRB5*0101, DP*0401 et DP*0402.

5°) Mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que les peptides issus de la protéine C du virus de l'hépatite C, sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- a) les peptides correspondant respectivement aux positions 19-47, 27-51, 31-57, 104-133 et 127-167,
- b) les peptides d'au moins 11 acides aminés inclus dans les peptides tels que définis en a), et
- c) les peptides dérivés des peptides tels que définis en a) ou en b) par substitution par des résidus alanine (C → A), de résidu(s) cystéine situé(s) en position + 1 ou + 2, relativement au résidu d'acide aminé en position N terminale et/ou en position -1, - 2 ou - 3, relativement au résidu d'acide aminé en position C terminale.

6°) Mélange de peptides selon la revendication 5, caractérisé en ce que les peptides d'au moins 11 acides aminés tels que définis en b) sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- le peptide inclus dans le peptide 27-51 correspondant aux positions 27-41,
- le peptide inclus dans le peptide 31-57 correspondant aux positions 31-45, et
- les peptides inclus dans le peptide 127-167 correspondant respectivement aux positions 127-149, 131-145, 131-148, 131-167, 134-148 et 148-167.

7°) Mélange de peptides selon la revendication 5, caractérisé en ce que les peptides tels que définis en c) sont sélectionnés dans le groupe constitué par le peptide dérivé du peptide C 127-149 de séquence SEQ ID NO: 5.

8°) Mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisé en ce que les peptides issus de la protéine NS3, sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- d) les peptides correspondant respectivement aux positions 1007-1037, 1036-1055, 1052-1072, 1076-1093, 1127-1153, 1149-1172, 1174-1195, 1190-1212, 1206-1239, 1246-1275, 1275-1304, 1361-1387, 1377-1403, 1404-1432, 1456-1481, 1495-1513, 1524-1553 et 1552-1583,

e) les peptides d'au moins 11 acides aminés inclus dans les peptides précédents, et

f) les peptides dérivés des peptides tels que définis en d) ou en e) par substitution par des résidus alanine (C → A), de résidu(s) cystéine situé(s) en position + 1 ou + 2, relativement au résidu d'acide aminé en position N terminale et/ou en position -1, - 2 ou - 3, relativement au résidu d'acide aminé en position C terminale.

9°) Mélange de peptides selon la revendication 8, caractérisé en ce que les peptides d'au moins 11 acides aminés tels que définis en e) sont sélectionnés dans le groupe constitué par :

- les peptides inclus dans le peptide 1007-1037 correspondant respectivement aux positions 1007-1021, 1015-1029, 1015-1037, 1019-1033 et 1020-1034,

- les peptides inclus dans le peptide 1174-1195 correspondant respectivement aux positions 1174-1188, 1174-1192 et 1178-1192,
- les peptides inclus dans le peptide 1190-1212 correspondant respectivement aux positions 1190-1204 et 1192-1206,
- 5 - les peptides inclus dans le peptide 1246-1275 correspondant respectivement aux positions 1246-1260, 1246-1264, 1250-1264 et 1261-1275,
- les peptides inclus dans le peptide 1377-1403 correspondant respectivement aux positions 1381-1395, 1381-1397, 1381-1403 et 1383-1397,
- le peptide inclus dans le peptide 1495-1513 correspondant respecti-
10 vement aux positions 1495-1509,
- les peptides inclus dans le peptide 1524-1553 correspondant respectivement aux positions 1524-1552, 1524-1538, 1528-1542, 1528-1552, 1529-1543, 1534-1548, 1538-1552 et 1540-1553, et
- les peptides inclus dans le peptide 1552-1583 correspondant
15 respectivement aux positions 1559-1573 et 1563-1577.

10°) Mélange de peptides selon la revendication 8, caractérisé en ce que les peptides tels que définis en f) sont sélectionnés dans le groupe constitué par les séquences SEQ ID NO: 10, 13, 20, 22 et 24 et les séquences dérivées de la séquence SEQ ID NO: 24 correspondant respectivement aux positions 1524-1538, 1524-1552,
20 1528-1552, 1538-1552 et 1540-1553.

11°) Mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce qu'il inclut des peptides issus des protéines C et NS3 du Virus de l'hépatite C de génotype 1.

12°) Mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications
25 1 à 11, caractérisé en ce qu'il inclut 2 à 6 peptides différents issus des protéines C et NS3, l'ensemble des peptides se liant à au moins 10 molécules HLA II dont la fréquence allélique est supérieure à 5 % dans la population caucasienne.

13°) Mélange de peptides selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il inclut des peptides sélectionnés dans le groupe constitué par les peptides issus
30 de la protéine C correspondant respectivement aux positions 27-51, 131-167, 127-149, 131-148, 148-167 et les peptides issus de la protéine NS3 correspondant respective-

ment aux positions 1007-1037, 1015-1037, 1036-1055, 1174-1192, 1190-1212, 1246-1264, 1381-1403, 1381-1397, 1524-1553, 1528-1552 et 1552-1583.

14°) Mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, caractérisé en ce qu'il est sous forme d'une protéine de fusion comprenant une séquence des peptides dudit mélange, à l'exclusion de la séquence correspondant à la fusion des peptides C 31-45, C 141-155 et NS3 1207-1221.

15°) Molécule d'acide nucléique, caractérisée en ce qu'elle code pour une protéine de fusion selon la revendication 14.

16°) Vecteur recombinant, caractérisé en ce qu'il comprend une molécule d'acide nucléique selon la revendication 15.

17°) Cellule, caractérisée en ce qu'elle est transformée par un vecteur selon la revendication 16.

18°) Composition immunogène anti-VHC, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins :

15 - un mélange de peptides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14, et/ou

- une molécule d'acide nucléique selon la revendication 15, ou
- un vecteur recombinant selon la revendication 16,

en association avec au moins un véhicule pharmaceutiquement acceptable et éventuellement au moins un adjuvant.

19°) Composition immunogène selon la revendication 18, caractérisée en ce que lesdits peptides sont sous forme de peptides modifiés ou bien associés à des liposomes ou à des lipides, notamment sous forme de lipopeptides.

20°) Composition immunogène selon la revendication 18 ou la revendication 19, caractérisée en ce que ledit mélange de peptides est associé :

- à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes CD8+ et plus particulièrement des épitopes CD8+ issus d'une protéine du VHC tels que les peptides C 2-10, 28-36, 35-44, 41-49, 42-50, 85-98, 88-97, 127-140, 131-140, 132-140, 167-176, 178-187, 181-190 ; les peptides E1 220-227, 233-242, 234-242, 363-371 ; les peptides E2 401-411, 460-469, 489-496, 569-578, 621-628, 725-733 ; les peptides NS2 826-838, 838-845 ; les peptides NS3 1073-1081, 1169-1177, 1287-1296, 1395-1403, 1406-1415 ; les peptides NS4A 1585-1593, 1666-

1675 ; les peptides NS4B 1769-1777, 1789-1797, 1807-1816, 1851-1859 ; le peptide NS5A 2252-2260 et les peptides NS5B 2588-2596, 2727-2735.

- à d'autres peptides comprenant des épitopes CD4+ multiples, tels que le peptide de la toxine tétanique TT (positions 830-846), le peptide de l'hémagglutinine d'*Influenza* HA (positions 307-319), PADRE et le peptide LSA3 de *Plasmodium falciparum* et/ou

- à un ou plusieurs peptides ou lipopeptides contenant un ou plusieurs épitopes B, plus particulièrement des épitopes B issus d'une protéine du VHC reconnus spécifiquement par des anticorps dirigés contre ces derniers, tels que
10 tels que le peptide C 5-27, le peptide NS4 1698-1719 et le peptide NS5 2295-2315.

21°) Vaccin, caractérisé en ce qu'il inclut une composition immuno-gène selon l'une quelconque des revendications 18 à 20.

22°) Peptides issus d'une protéine C ou NS3 du VHC caractérisés en ce qu'ils sont sélectionnés dans le groupe constitué par : les peptides issus de la
15 protéine C, tels que définis à l'une quelconque des revendications 1, 3 à 7, 11, 13 et 14, à l'exclusion du peptide C 31-45, C 21-40, C 20-44, C 23-42, C 111-130, C 109-128, C 128-152, C 131-150, C 133-152, C 138-162, C 141-155, C 142-161, C 141-160 et C 145-164, et les peptides issus de la protéine NS3 choisis parmi :

- les peptides correspondant respectivement aux positions 1007-
20 1037, 1036-1055, 1052-1072, 1076-1093, 1127-1153, 1149-1172, 1174-1195, 1190-1212, 1206-1239, 1275-1304, 1361-1387, 1377-1403, 1404-1432, 1456-1481, 1495-1513, 1524-1553 et 1552-1583 et les peptides d'au moins 11 acides aminés inclus dans les peptides précédents, tels que définis aux revendications 8 et 9, à l'exclusion des peptides NS3 1384-1401 et NS3 1207-1221,

25 - les peptides correspondant respectivement aux positions 1246-1260 et 1261-1275, tels que définis à la revendication 9,

- les peptides dérivés des peptides précédents par substitution par des résidus alanine (C → A), de résidu(s) cystéine situé(s) en position + 1 ou + 2, relativement au résidu d'acide aminé en position N terminale et/ou en position -1, - 2
30 ou - 3, relativement au résidu d'acide aminé en position C terminale, tels que définis aux revendications 8 et 10, et

- les peptides dérivés des peptides précédents, tels que définis aux revendications 11 et 14.

23°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un peptide selon la revendication 22 ou un mélange de peptides selon l'une
5 quelconque des revendications 1 à 14, éventuellement marqué ou complexé, sous la forme de complexes multimériques.

24°) Procédé d'évaluation de l'état immunitaire d'un individu, caractérisé en ce qu'il comprend une étape de détection de la présence de cellules T CD4+ spécifiques des peptides C et/ou NS3 tels que définis aux revendications 1 à 14.

10 25°) Méthode de tri de lymphocytes T spécifiques du VHC, caractérisé en ce qu'il comprend au moins les étapes suivantes :

- mise en contact, d'une suspension de cellules à trier avec un ou plusieurs tétramères marqués formés à partir de complexes entre des peptides C et/ou NS3 tels que définis aux revendications 1 à 14 et des molécule HLA II solubles , et

15 - tri des cellules marquées par les tétramères.

1/5

8N1007-1037 GREILLGFPADGMVSKGWRL LAPITAYAQQTR
 N1007-1021 GREILLGFPADGMVSK
 N1011-1025 LLGFPADGMVSKGWRL
 N1015-1029 ADGMVSKGWRL LAP I
 N1019-1033 VSKGWRL LAPITAYA
 N1020-1034 SKGWRL LAPITAYAQ
 N1024-1037 RLLAPITAYAQQTR
 15N1174-1195 GHAVGIFRAAVCTRGVAKAVDF
 N1174-1188 GHAVGIFRAAVCTRG
 N1178-1192 GIFRAAVCTRGVAKA
 N1181-1195 RAAVCTRGVAKAVDF
 28N1524-1553 GAAWYELTPAETTVRLRAYMNT PGLPVAQD
 N1524-1538 GAAWYELTPAETTVR
 N1528-1542 YELTPAETTVRLRAY
 N1529-1543 ELTPAETTVRLRAYM
 N1534-1548 ETTVRLRAYMNT PGL
 N1538-1552 RLRAYMNT PGLPVAQ
 N1540-1553 RAYMNT PGLPVAQD
 18N1246-1275 AQQYKVLVLNPSVAAATLGF GAYMSKAHGID
 N1246-1260 AQQYKVLVLNPSVAA
 N1250-1264 KVLVLNPSVAAATLGF
 N1255-1269 NPSVAAATLGF GAYMS
 N1261-1275 TLGF GAYMSKAHGID
 1C19-47 PQDVKFPGGGQIVGGVYLLPRRGR L GVR
 2C31-57 VGGVYLLPRRGR L GVRATRKTSERSQ
 C19-33 PQDVKFPGGGQIVGG
 C27-41 GGQIVGGVYLLPRRG
 C31-45 GGVYLLPRRGR L GVR
 C43-57 RL GVRATRKTSERSQ
 5C127-149 TAGFADLMGYIPLVGAPLGGAA
 6C148-173 ARALAHGVRVLEDGVNYATGNLPGAS
 C127-141 TAGFADLMGYIPLVG
 C131-145 ADLMGYIPLVGAPLG
 C134-148 MGYIPLVGAPLGGAA
 C141-155 GAPLGGAAARALAHGV
 C148-163 ARALAHGVRVLEDGV
 C152-166 AHGVRVLEDGVNYAT
 C159-173 EDGVNYATGNLPGAS
 16N1190-1212 AKAVDFIPVENLETTMRSPVFTD
 N1190-1204 AKAVDFIPVENLETT
 N1192-1206 AVDFIPVENLETTMR
 N1196-1210 IPVENLETTMRSPVF
 N1199-1212 ENLETTMRSPVFTD
 19N1275-1304 DPNIRTGVRTITTGSPITYSTYKFLADGG
 N1275-1289 DPNIRTGVRTITGSG
 N1279-1293 RTGVRTITTGSPITY
 N1283-1297 RTITTGSPITYSTYG
 N1290-1304 PITYSTYKFLADGG
 10N KNQVEGEVQIVSTAAQTFLAT
 N1052-1066 KNQVEGEVQIVSTAA
 N1056-1070 EGEVQIVSTAAQTFL
 23N GKAIPLVLEIKGGRHLIFCHSKKKKADEL
 N1377-1391 GKAIPLVLEIKGGRHL
 N1381-1395 PLVLEIKGGRHLIFCH
 N1383-1397 EVIKGGRHLIFCHSK
 N1389-1403 RHLIFCHSKKKKADEL
 27N KPGIYRFVAPGERPSGMFD
 N1495-1509 KPGIYRFVAPGERPS
 N1500-1513 RFVAPGERPSGMFD
 29N QDHLFEWEGVFTGLTHIDAHFLSQTQSGENL
 1554-1568 HLEFEWEGVFTGLTHI
 1565-1579 LTHIDAHFLSQTQKS

Figure 1

	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5	DF4B1	DF4B2	ND
28N1456-1481	2	575	8	20	350	300	180	40	350	750	nd	nd	10
8N1007-1037	2	200	10	88	1	1250	30	15000	60	2	7205	881	9
28N1524-1553	2	1375	13	5	18	10000	1	663	30	20	6296	141	9
8N1007-1037	350	>100000	70000	483	58	288	158	>100000	6000	9	4524	750	7
10N1052-1072	400	2250	24	7	200	nd	300	10000	400	19	2034	1183	7
15N1174-1195	3	30000	30	33	45	10000	90	4500	98	20	17818	2975	7
10N1275-1304	150	>100000	500	113	16	>100000	550	150	3500	1300	548	1825	7
28N1322-1383	475	17500	1875	275	100	6500	500	4125	1500	325	575	615	7
28N1322-1383	233	>100000	35000	500	38	325	133	>100000	17500	3	>100000	>100000	6
16N1152-1163	600	2750	28	35	90	4500	700	25000	1250	725	4106	1438	6
18N1246-1272	1	2500	5	15	40	900	58	>30000	2500	1250	>100000	11402	6
28N1377-1403	13	7750	3000	750	178	163	2625	>10000	900	3	11004	1672	6
27N1405-1513	163	>100000	1250	313	175	>100000	350	40000	138	2	>100000	>100000	6
8N1036-1055	9	10000	38333	14	217	>100000	350	>100000	1083	3	5957	5428	5
11N1076-1093	138	>100000	1500	13	650	>100000	450	6000	60000	100	31072	11292	5
13N1127-1153	700	>100000	3500	11	177	300	3250	>10000	2500	900	>100000	>100000	5
14N1149-1172	8	>100000	9000	105	1947	>100000	825	>10000	100	567	>100000	>100000	5
17N1206-1239	55	25000	425	575	1500	100000	10000	22500	3875	350	64307	14550	5
26N1404-1432	50	>100000	140	575	1500	100000	10000	22500	3875	350	64307	14550	5
4C104-133	118	5167	1033	125	867	>100000	1250	17500	3333	433	13925	5384	4
22N1362-1387	33	21250	1625	20	3000	>100000	425	32500	4000	200	8005	10284	4
12N1094-1119	>10000	nd	475	nd	87	nd	48	>10000	nd	nd	>10000	>10000	1
3C93-107	6333	50000	60000	6500	87	>100000	27500	>100000	5000	2567	>100000	>100000	1
6C148-173	10000	3500	30	3167	4333	9500	6667	4833	27500	4333	>100000	31582	1

Figure 2

3/5

	DR1	DR3	DR4	DR7	DR11	DR13	DR15	DRB3	DRB4	DRB5	DP401	DP402	Nb
N1007-1021	9	325	5500	15000	2417	>10000	34	70000	83	1400	>100000	350	5
N1011-1025	2125	>10000	>100000	188	100000	>10000	25500	>100000	80000	6750	>100000	>100000	1
N1015-1029	2	>10000	4250	138	30	>10000	417	>100000	17500	200	51299	2983	5
N1019-1033	0.4	>10000	4	413	1	>10000	73	60000	1250	2	>100000	>100000	6
N1029-1034	0.5	>10000	14	360	1	>10000	52	>100000	517	3	>100000	20000	7
N1024-1037	225	>10000	14750	5000	925	1500	102	>100000	1050	1400	27386	11361	3
N1174-1188	4	>10000	700	525	750	20000	45	>100000	583	23	19774	1538	7
N1178-1192	2	>100000	33	145	40	15000	1150	10000	7500	19	>100000	>100000	5
N1181-1194	1800	>100000	60000	20000	20000	>100000	51000	>100000	48333	3250	>100000	>100000	0
N1524-1538	3	>10000	285	63	280	>10000	11067	>10000	>100000	230	12051	1119	6
N1528-1542	950	6000	2000	980	325	>10000	450	>10000	>100000	90	>100000	22863	5
N1529-1543	450	>10000	8750	30000	228	>10000	117	>10000	55000	1300	>100000	>100000	3
N1534-1548	100	>10000	535	350	100	10000	2	>10000	128	517	51844	23950	7
N1538-1552	2	>10000	80	10	16	>10000	9	2000	1500	18	1711	182	7
N1540-1553	9	>10000	450	25	275	>10000	6500	>10000	60000	198	13949	2390	5
N1246-1260	6	12000	18	275	53	11500	150	90000	30000	2200	nd	nd	5
N1250-1264	9	4250	20	8	390	10000	210	40000	6500	450	nd	nd	6
N1255-1269	630	>100000	9000	625	5000	>100000	1150	>100000	>100000	4250	nd	nd	2
N1261-1275	650	>100000	16500	66	83	>100000	700	>100000	>100000	850	nd	nd	5
C19-33	21750	>10000	>100000	70000	>100000	>100000	600	>10000	>100000	>100000	>100000	73485	1
C27-41	1550	>10000	>100000	6333	140	4967	890	>10000	23000	1600	667	158	4
C31-45	80	>10000	35000	1400	68	533	25	>10000	40000	16	nd	nd	5
C43-57	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0
C127-141	67	>10000	45000	16300	7500	>100000	780	4500	>100000	6667	1095	3000	2
C131-145	1	>10000	2600	51	475	>100000	18	>10000	1033	11	9000	15000	5
C134-148	1	>10000	3000	73	733	>100000	110	>10000	>100000	9	5000	3454	5
C141-155	3500	>10000	80000	11800	490	>100000	50050	>10000	>100000	8333	9487	5916	1
C148-163	1330	>100000	71667	575	3600	3023	2433	25000	62500	13000	nd	nd	1
C152-166	50000	6333	1500	35350	25000	>100000	20000	9000	>100000	>100000	nd	nd	0
C159-173	45000	>100000	36667	25450	60000	>100000	12500	>100000	>100000	>100000	nd	nd	0
N1190-1204	417	>100000	1633	157	140	>100000	400	>100000	>100000	4467	5674	2507	4
N1192-1206	140	>100000	575	140	150	>100000	1550	>100000	>100000	1467	7731	1558	4
N1196-1210	2567	3700	1750	27500	1467	7000	7000	>100000	>100000	1433	63164	28020	0
N1199-1212	3000	4000	22500	12000	3000	6000	7500	>100000	>100000	32500	6023	2397	0
N1275-1289	2667	>10000	40333	1933	1850	>10000	10000	>100000	>100000	16000	55000	>100000	0
N1279-1293	1217	>10000	9667	3100	83500	>10000	21000	>100000	6900	21500	28140	40149	0
N1283-1297	800	>10000	22000	10933	>100000	>10000	4500	>100000	>100000	80000	80000	>100000	1
N1290-1304	3500	>10000	25667	1013	100	>10000	135	550	>100000	3000	1633	1238	3
N1052-1066	35000	>100000	20000	28000	9000	>100000	27000	>100000	70000	90000	nd	nd	0
N1056-1070	1650	>100000	700	105	26000	>100000	>100000	>100000	>100000	170	nd	nd	3
N1377-1391	2250	>100000	45000	10000	1700	>100000	10500	>100000	40667	100	25664	8052	1
N1381-1395	24	1250	3230	1550	540	140	690	>100000	10667	150	>100000	>100000	5
N1383-1397	60	4250	3050	700	68	375	1500	80000	31000	180	>100000	>100000	5
N1389-1403	7000	>100000	>100000	8000	3000	>100000	43000	>100000	>100000	43	>100000	>100000	1
N1495-1509	105	nd	1950	950	355	nd	50	>100000	3167	2	nd	nd	5
N1500-1513	3750	nd	55000	6500	70000	nd	33500	>100000	>100000	5500	nd	nd	0
N1554-1568	1200	>100000	8250	1800	675	>100000	1000	>100000	>100000	1350	347	315	3
N1565-1579	550	>100000	12500	6000	280	>100000	31500	>100000	>100000	575	25000	16631	3

Figure 3

4/5

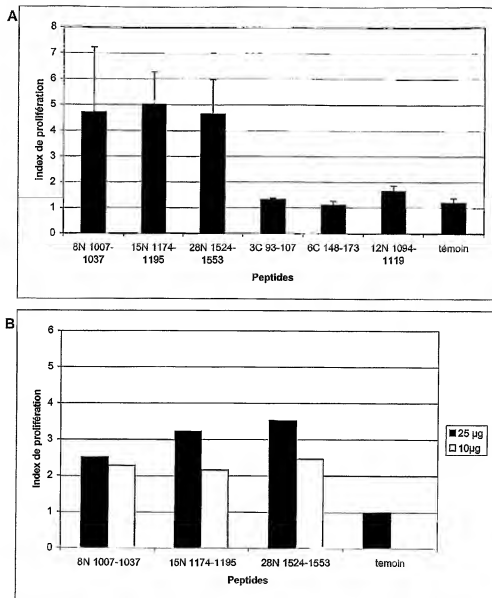


Figure 4

5/5

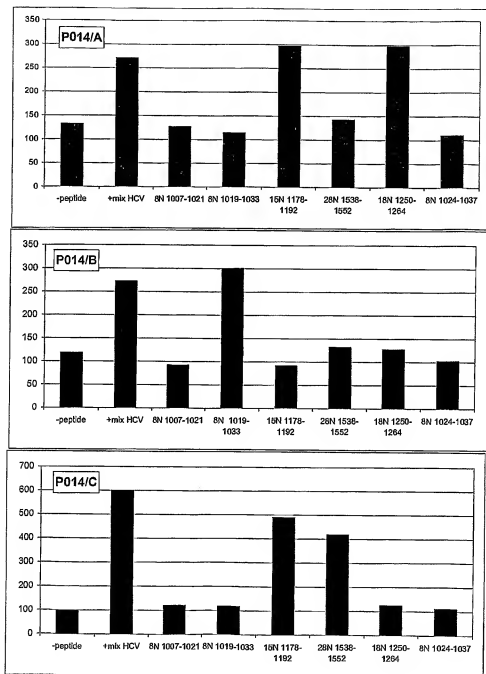


Figure 5

263682.ST25
SEQUENCE LISTING

<110> COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE

SEDAC THERAPEUTICS
MAILLIERE Bernard
GEORGES Bertrand
CASTELLI Florence
BOUZIDI Ahmed

<120> MELANGE DE PEPTIDES ISSUS DES PROTEINES C ET NS3 DU VIRUS DE L'HEPATITE C
ET LEURS APPLICATIONS

<130> BLO/HLP/cpF263/82FR

<160> 86

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val
1 5 10 15

Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val Arg
20 25

<210> 2

<211> 27

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val
1 5 10 15

Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln
Page 1

20 25 263s82.ST25

<210> 3
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 3
 Trp Ala Gly Trp Leu Leu Ser Pro Arg Gly Ser Arg Pro Ser Trp
 1 5 10 15

<210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 4
 Arg Pro Ser Trp Gly Pro Thr Asp Pro Arg Arg Arg Ser Arg Asn Leu
 1 5 10 15

Gly Lys Val Ile Asp Thr Leu Thr Cys Gly Phe Ala Asp Leu
 20 25 30

<210> 5
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 5
 Thr Ala Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg
 20

<210> 6
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

263s82.ST25

<400> 6

Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn
 1 5 10 15

Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Ala Ser
 20 25

<210> 7

<211> 31

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 7

Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly
 1 5 10 15

Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg
 20 25 30

<210> 8

<211> 20

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 8

Thr Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp
 1 5 10 15

Lys Asn Gln Val
 20

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 9

Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln
 1 5 10 15

Thr Phe Leu Ala Thr

263s82.ST25

20

<210> 10

<211> 18

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 10

Gly Val Ala Trp Thr Val Tyr His Gly Ala Gly Thr Arg Thr Ile Ala
 1 5 10 15

Ser Pro

<210> 11

<211> 26

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 11

Lys Gly Pro Val Ile Gln Met Tyr Thr Asn Val Asp Gln Asp Leu Val
 1 5 10 15

Gly Trp Pro Ala Pro Gln Gly Ser Arg Ser
 20 25

<210> 12

<211> 27

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 12

Ser Ser Asp Leu Tyr Leu Val Thr Arg His Ala Asp Val Ile Pro Val
 1 5 10 15

Arg Arg Arg Gly Asp Ser Arg Gly Ser Leu Leu
 20 25

<210> 13

<211> 24

<212> PRT

263s82.ST25

<213> Hepatitis C virus

<400> 13

Arg Gly Ser Leu Leu Ser Pro Arg Pro Ile Ser Tyr Leu Lys Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Gly Gly Pro Leu Leu Ala Pro
 20

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 14

Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val
 1 5 10 15

Ala Lys Ala Val Asp Phe
 20

<210> 15

<211> 23

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 15

Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr Thr Met
 1 5 10 15

Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp
 20

<210> 16

<211> 34

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 16

Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp Asn Ser Ser Pro Pro Val Val Pro Glu
 Page 5

5

263s82.ST25
10

15

er Phe Gln Val Ala His Leu His Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Ser
20 25 30

hr Lys

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 17

Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr
1 5 10 15

Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp
20 25 30

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 18

Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro
1 5 10 15

Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly
20 25 30

<210> 19

<211> 26

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 19

Ile Glu Glu Val Ala Leu Ser Thr Thr Gly Glu Ile Pro Phe Tyr Gly
1 5 10 15

Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly
Page 6

20

25 263s82.ST25

<210> 20

<211> 27

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 20

Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile
 1 5 10 15

Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Ala Asp Glu Leu
 20 25

<210> 21

<211> 29

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 21

Ala Ala Lys Leu Val Ala Leu Gly Ile Asn Ala Val Ala Tyr Tyr Arg
 1 5 10 15

Gly Leu Asp Val Ser Val Ile Pro Thr Ser Gly Asp Val
 20 25

<210> 22

<211> 26

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 22

Thr Ala Val Thr Gln Thr Val Asp Phe Ser Leu Asp Pro Thr Phe Thr
 1 5 10 15

Ile Glu Thr Ile Thr Leu Pro Gln Asp Ala
 20 25

<210> 23

<211> 19

<212> PRT

263s82.ST25

<213> Hepatitis C virus

<400> 23

Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly
 1 5 10 15

Met Phe Asp

<210> 24

<211> 30

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 24

Gly Ala Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Ala Gln Asp
 20 25 30

<210> 25

<211> 32

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 25

Gln Asp His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His
 1 5 10 15

Ile Asp Ala His Phe Leu Ser Gln Thr Lys Gln Ser Gly Glu Asn Leu
 20 25 30

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 26

Gly Arg Glu Ile Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys
 Page 8

1 5 263s82.ST25 15
10

<210> 27
<211> 15
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 27
Leu Leu Gly Pro Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp Arg Leu
1 5 10 15

<210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 28
Ala Asp Gly Met Val Ser Lys Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile
1 5 10 15

<210> 29
<211> 15
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 29
Val Ser Lys Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala
1 5 10 15

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> Hepatitis C virus

<400> 30
Ser Lys Gly Trp Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln
1 5 10 15

<210> 31

263s82.ST25

<211> 14
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 31
 Arg Leu Leu Ala Pro Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Gln Thr Arg
 1 5 10

<210> 32
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 32
 Gly His Ala Val Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly
 1 5 10 15

<210> 33
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 33
 Gly Ile Phe Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala
 1 5 10 15

<210> 34
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 34
 Arg Ala Ala Val Cys Thr Arg Gly Val Ala Lys Ala Val Asp Phe
 1 5 10 15

<210> 35
 <211> 15
 <212> PRT

263s82.ST25

<213> Hepatitis C virus

<400> 35

Gly Ala Ala Trp Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 36

Tyr Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 37

Glu Leu Thr Pro Ala Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 38

Glu Thr Thr Val Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

263s82.ST25

<400> 39

Arg Leu Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Ala Gln
 1 5 10 15

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 40

Arg Ala Tyr Met Asn Thr Pro Gly Leu Pro Val Ala Gln Asp
 1 5 10

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 41

Ala Gln Gly Tyr Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 42

Lys Val Leu Val Leu Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe
 1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 43

Asn Pro Ser Val Ala Ala Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser
 Page 12

1 5 263s82.ST25 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 44

Thr Leu Gly Phe Gly Ala Tyr Met Ser Lys Ala His Gly Ile Asp
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 45

Pro Gln Asp Val Lys Phe Pro Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly
1 5 10 15

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 46

Gly Gly Gly Gln Ile Val Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 47

Gly Gly Val Tyr Leu Leu Pro Arg Arg Gly Pro Arg Leu Gly Val
1 5 10 15

<210> 48

263s82.ST25

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 48

Arg Leu Gly Val Arg Ala Thr Arg Lys Thr Ser Glu Arg Ser Gln
1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 49

Thr Ala Gly Phe Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 50

Ala Asp Leu Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly
1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 51

Met Gly Tyr Ile Pro Leu Val Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala
1 5 10 15

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

263s82.ST25

<213> Hepatitis C virus

<400> 52

Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ala Ala Arg Ala Leu Ala His Gly
1 5 10

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 53

Ala Arg Ala Leu Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val
1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 54

Ala His Gly Val Arg Val Leu Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr
1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 55

Glu Asp Gly Val Asn Tyr Ala Thr Gly Asn Leu Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

263s82.ST25

<400> 56

Ala Lys Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr Thr
 1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 57

Ala Val Asp Phe Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr Thr Met Arg
 1 5 10 15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 58

Ile Pro Val Glu Asn Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe
 1 5 10 15

<210> 59

<211> 14

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 59

Glu Asn Leu Glu Thr Thr Met Arg Ser Pro Val Phe Thr Asp
 1 5 10

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 60

Lys Asn Gln Val Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala

1 5 263s82.ST25 10 15

<210> 61
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 61
 Glu Gly Glu Val Gln Ile Val Ser Thr Ala Ala Gln Thr Phe Leu
 1 5 10 15

<210> 62
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 62
 Gly Lys Ala Ile Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu
 1 5 10 15

<210> 63
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 63
 Pro Leu Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His
 1 5 10 15

<210> 64
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Hepatitis C virus

<400> 64
 Glu Val Ile Lys Gly Gly Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys
 1 5 10 15

<210> 65

263s82.ST25

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 65

Arg His Leu Ile Phe Cys His Ser Lys Lys Lys Ala Asp Glu Leu
 1 5 10 15

<210> 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 66

Lys Pro Gly Ile Tyr Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser
 1 5 10 15

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 67

Arg Phe Val Ala Pro Gly Glu Arg Pro Ser Gly Met Phe Asp
 1 5 10

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 68

His Leu Glu Phe Trp Glu Gly Val Phe Thr Gly Leu Thr His Ile
 1 5 10 15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

263s82.ST25

<213> Hepatitis C virus

<400> 69

Leu	Thr	His	Ile	Asp	Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser
1				5					10					15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 70

Glu	Gly	Val	Phe	Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp	Ala	His	Phe	Leu
1				5					10					15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 71

Thr	Gly	Leu	Thr	His	Ile	Asp	Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys
1				5					10					15

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 72

Asp	Ala	His	Phe	Leu	Ser	Gln	Thr	Lys	Gln	Ser	Gly	Glu	Asn	Leu
1				5					10					15

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

263s82.ST25

<400> 73

Arg Gly Leu Leu Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp
 1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 74

Gly Cys Ile Ile Thr Ser Leu Thr Gly Arg Asp Lys Asn Gln Val
 1 5 10 15

<210> 75

<211> 13

<212> PRT

<213> Influenza virus

<400> 75

Pro Lys Tyr Val Lys Gln Asn Thr Leu Lys Leu Ala Thr
 1 5 10

<210> 76

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Ala Ala Tyr Ala Ala Ala Lys Ala Ala Ala Leu Ala Ala
 1 5 10

<210> 77

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Gly Leu Glu

1 5 263s82.ST25
10

<210> 78
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 78

Thr Glu Arg Val Arg Leu Val Thr Arg His Ile Tyr Asn Arg Glu Glu
1 5 10 15

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Glu Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Asp Gly Thr Gly Val Glu
1 5 10 15

<210> 80
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 80

Glu Ser Trp Gly Ala Val Trp Arg Ile Asp Thr Pro Asp Lys Leu Thr
1 5 10 15

Gly Pro Phe Thr
20

<210> 81
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 81

Ala Gly Asp Leu Leu Ala Ile Glu Thr Asp Lys Ala Thr Ile
page 21

1 5 263s82.ST25
10

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Glu Lys Lys Tyr Phe Ala Ala Thr Gln Phe Glu Pro Leu Ala Ala Arg
1 5 10 15

Leu

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 83

Asp Pro Asn Ile Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser
1 5 10 15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 84

Arg Thr Gly Val Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr
1 5 10 15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 85

Arg Thr Ile Thr Thr Gly Ser Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly

263s82.ST25
10

1 5 15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Hepatitis C virus

<400> 86

Pro Ile Thr Tyr Ser Thr Tyr Gly Lys Phe Leu Ala Asp Gly Gly
1 5 10 15